

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL

EFFETS DE L'HEXANOATE, UN ACIDE GRAS À CHAÎNE MOYENNE, SUR
LE MÉTABOLISME DES LIPIDES ET LA SENSIBILITÉ À L'INSULINE DES
HÉPATOCYTES

MÉMOIRE

PRÉSENTÉ

COMME EXIGENCE PARTIELLE

DE LA MAÎTRISE EN SCIENCES BIOLOGIQUES

PAR

RIAL AHMED SABRI

SEPTEMBRE 2015

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL
Service des bibliothèques

Avertissement

La diffusion de ce mémoire se fait dans le respect des droits de son auteur, qui a signé le formulaire *Autorisation de reproduire et de diffuser un travail de recherche de cycles supérieurs* (SDU-522 – Rév.01-2006). Cette autorisation stipule que «conformément à l'article 11 du Règlement no 8 des études de cycles supérieurs, [l'auteur] concède à l'Université du Québec à Montréal une licence non exclusive d'utilisation et de publication de la totalité ou d'une partie importante de [son] travail de recherche pour des fins pédagogiques et non commerciales. Plus précisément, [l'auteur] autorise l'Université du Québec à Montréal à reproduire, diffuser, prêter, distribuer ou vendre des copies de [son] travail de recherche à des fins non commerciales sur quelque support que ce soit, y compris l'Internet. Cette licence et cette autorisation n'entraînent pas une renonciation de [la] part [de l'auteur] à [ses] droits moraux ni à [ses] droits de propriété intellectuelle. Sauf entente contraire, [l'auteur] conserve la liberté de diffuser et de commercialiser ou non ce travail dont [il] possède un exemplaire.»

REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier le professeur Catherine Mounier de m'avoir ouvert les portes de son laboratoire, un certain été 2012, pour un stage d'initiation à la recherche scientifique. Je remercie Catherine d'avoir par la suite choisi de me renouveler sa confiance en m'offrant l'opportunité de poursuivre dans le même laboratoire mes études de deuxième cycle. C'est donc à Catherine, à son accueil, sa disponibilité, son sens du partage des connaissances, sa bonne humeur rompue à toute épreuve et à son soutien sans faille que je dois la réalisation du présent mémoire.

La récolte des données nécessaires à l'élaboration de cette étude n'aurait pas été suffisante sans l'aide inestimable des étudiants stagiaires que j'ai eu le grand privilège d'encadrer sous la direction de Catherine Mounier. Je tiens donc à nommer, remercier, et féliciter pour le brio de leur travail effectué parmi nous, Sana Rafrafi, Hugo Veilleux, Mourad Benchouchou, Solange Vivier et Camilo Montesco.

L'ambiance de travail exceptionnelle propre au Labo Mounier, et que plus d'un nous envie, est un harmonieux mélange de motivation, de bonne humeur, de rigueur dans le travail accompli, d'abnégation dans la réalisation des tâches, de fous rires et de sympathie ... le tout sur fond de "poste radio bleu".

Cette ambiance de travail si propice à mon épanouissement scientifique et à la réalisation de mes études de deuxième cycle, je la dois à mes chers collègues et amis. Il y a tout d'abord Amine Lounis qui a accepté de m'encadrer lors de mon stage d'initiation à la recherche scientifique. Notre relation professionnelle s'est immédiatement muée en grande amitié. Il y a aussi ma chère amie Giselle Molina Fernandez, ma maman du labo qui m'a tant appris au début de ma maîtrise. Nos discussions extrascientifiques furent d'un enrichissement intellectuel supplémentaire. Je ne peux ne pas évoquer Fatma Bouazizi, Simon Lalonde et Frédéric Desmarais dont le soutien tant moral que scientifique fut d'une grande importance pour moi.

Je remercie les professeurs Catherine Jumarie et Robert Moreau pour leurs conseils dans l'élaboration de ma méthodologie, ainsi que les professeurs Annabi Borhane et Jenabian Mohammad-Ali pour leurs conseils de rédaction.

Je remercie aussi Gisèle Legault pour sa précieuse contribution à la mise en page du présent mémoire.

J'exprime également ma gratitude à l'ensemble des membres du Biomed et du pavillon des sciences biologiques, professeurs, collègues étudiants, stagiaires postdoctoraux et techniciens pour leurs conseils, leur aide et leur prêt de matériel.

Je dois des remerciements particuliers aux membres du laboratoire de Diana Averill qui ont accepté de nous faire part de leur expérience dans l'extraction et la mise en culture des hépatocytes de rats.

Pour finir, je remercie tout spécialement mes parents et ma sœur, mes amis aussi, pour avoir supporté la fluctuation de mes humeurs inhérente au travail de recherche.

À mes parents et à ma sœur qui m'ont toujours soutenu

TABLE DES MATIÈRES

LISTE DES ABRÉVIATIONS	ix
LISTE DES FIGURES	xii
RÉSUMÉ	xiv
INTRODUCTION	1
CHAPITRE I	
ÉTAT DES CONNAISSANCES	4
1.1 L'anabolisme des lipides :	4
1.1.1 Les fonctions biologiques de la lipogenèse <i>de novo</i> (DNL) :	4
1.1.3 La lipogenèse <i>de novo</i> , une voie métabolique hautement régulée :	13
1.2 Désordre du métabolisme des lipides, obésité et conséquences :	25
1.2.1 L'étiologie de l'obésité :	25
1.2.2 Obésité, cancers et maladies cardiovasculaires :	26
1.2.3 L'obésité et la syndrome métabolique :	27
1.3 La lutte contre l'obésité par l'alimentation :	29
1.3.1 Les lipides bioactifs :	30
1.3.2 Les acides gras à chaînes moyennes (MCFA), des lipides bioactifs prometteurs :	34
1.4 Hypothèses et objectifs spécifiques du travail :	39
1.4.1 Hypothèses de travail :	39
1.4.2 Objectifs de l'étude :	40
CHAPITRE II	
MÉTHODOLOGIE	42
2.1 Produits et réactifs :	42

2.2 Extraction des cellules hépatiques de rats :	43
2.3 Cultures cellulaires :	44
2.4 Analyse de l'effet du C6 sur la synthèse <i>de novo</i> des triglycérides :	45
2.5 Analyse de l'effet du C6 sur les niveaux de transcription des gènes <i>FASN</i> et <i>ACACA</i> :	46
2.6 Analyse de l'effet du C6 sur l'activation de la voie PI3k/Akt induite par l'insuline :	47
2.7 Analyse de l'effet du C6 sur la synthèse de glycogène induite par l'insuline :	48
2.8 Étude de l'effet du C6 sur l'accumulation des acides phosphatidiques totaux : ...	49
2.9 Analyses statistiques :	49

CHAPITRE III RÉSULTATS

3.1 Le C6 inhibe la synthèse des triglycérides induite par l'hormone T3 et par l'insuline dans les hépatocytes :	50
3.2 Le C6 inhibe l'expression des gènes <i>FASN</i> et <i>ACACA</i> induite par l'hormone T3 et l'insuline :	53
3.4 La sensibilité à l'insuline des hépatocytes est accrue en présence du C6 dans des conditions lipotoxiques et non lipotoxiques :	59
3.5 L'augmentation de la sensibilité à l'insuline associée au C6 n'implique pas l'acide phosphatidique en guise d'intermédiaire métabolique :	62

CHAPITRE IV	
DISCUSSION ET PERSPECTIVES	65
4.1 Effet inhibiteur du C6 sur la voie de la lipogenèse <i>de novo</i> et de la synthèse des triglycérides dans les hépatocytes :	65
4.1.1 Remise en contexte de l'étude avec la théorie :	65
4.1.2 Le C6 limite la lipogenèse dans certaines conditions conformément aux données de la littérature :	68
4.1.3 Suggestion d'une base mécanistique expliquant l'inhibition de la lipogenèse <i>de novo</i> provoquée par le C6 lors d'un traitement hormonal...69	
4.1.4 Conformité des résultats de l'étude avec les implications cliniques attendues et les études menées <i>in-vivo</i> :	72
4.2 Analyse de l'effet bénéfique mais complexe du C6 sur la sensibilité à l'insuline dans les hépatocytes :	73
4.2.1 Remise en contexte de l'étude avec la théorie :	73
4.2.2 Le C6 inhibe Akt et active p70s6k : quelle conclusion est à tirer pour son effet sur la sensibilité à l'insuline ?	74
4.2.3 Le C6 favorise bel et bien la réponse des cellules à l'insuline :	75
4.2.4 Et si le C6 potentialisait les réponses cellulaires à l'insuline justement en instaurant une "insulinorésistance sélective" ?	76
4.2.5 L'induction directe de l'axe mTOR/pt70s6k pourrait être en cause dans la rétroinhibition de la voie PI3k/Akt :	78
4.2.6 L'administration de C6 n'augmente pas les taux d'acides phosphatidiques connus pour activer mTORC1 :	79
4.2.7 Le C6 est sûrement impliqué dans la régulation énergétique, et non nutritionnelle, de mTORC1 :	80
4.2.8 Récapitulatif du mécanisme général proposé pour les effets du C6 sur la sensibilité à l'insuline :	82

4.3 Conclusion :.....	82
4.4 Perspectives :.....	83
BIBLIOGRAPHIE	85

LISTE DES ABRÉVIATIONS

ACACA : Acétyl-CoA carboxylase

ACL : ATP-citrate lyase

ADP : Adénosine diphosphate

Akt : Nom alternatif de la protéine kinase B

ATP : Adénosine triphosphate

bHLH-Zip : *helix-loop-helix leucine zipper*

ChoRES : *Carbohydrate-responsive element-binding protein*

ChREBP : *Carbohydrate-responsive element-binding protein*

DGAT : Diglycérade acyltransférase

DHA : Docohexanoate

DNL : Lipogénèse *de novo*

EM : Enzyme malique

EPA : Eicosapentanoate

ErK1/2 : *Extracellular signal-regulated kinases 1 and 2*

FAD : Flavine adénine dinucléotide

FASN : Synthétase des acides gras

G6P : Glucose-6-phosphate

G6PD : Glucose-6-phosphate déshydrogénase

GH : Hormone de croissance

GLUT : Transporteur du glucose

HDL : Lipoprotéine de haute densité

IRS : Substrat du récepteur à l'insuline

JNK : *c-Jun N-Terminal kinase*

KDa : Kilodalton

LCT : Triglycéride à longue chaîne

L-PK : *Liver-pyruvate kinase*

LXR : *Liver X receptor*

MAPK : *Mitogen-activated protein kinases*

MCFA : Acide gras à chaîne moyenne

MCT : Triglycéride à longue chaîne

mTOR : *mammalian target of rapamycin*

MUFA : Acide gras mono-insaturé

NADH : *Nicotinamide adenine dinucleotide*

NAFLD : *non alcoholic fatty liver disease*

p70s6k : protéine S6 kinase ribosomale

PAP : ou AP : Acide phosphatidique

PKC : *phosphoinositide-dependent protein kinase*

PEP : Prolyl endopeptidase

Pi : Phosphate inorganique

PI3k : *phosphoinositide 3-kinase*

PIP2 : *phosphatidyl-inositol-diphosphate*

PIP3 : *Phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate*

PPAR γ : *Peroxisome proliferator-activated receptor gamma*

PUFA : acide gras poly-insaturé

ROS : Dérivés réactifs de l'oxygène

RXR : Récepteur X des rétinoïdes

SCAP : *SREBP cleavage-activating protein*

SCD : Stearoyl-CoA désaturase

SCFA : Acides gras à courtes chaînes

SFA : Acide gras saturé

SRE : *SREBP Response element*

SREBP: *Sterol regulatory element-binding protein*

T3 : Triiodothyronine

T4 : Thyroxine ou tétraiodothyronine

TH : Hormones thyroïdiennes

TNF α : Facteur de nécrose tumorale

TR : récepteur de l'hormone T3

TRE : *T3 responsive element*

VLDL : Lipoprotéine de très faible densité

LISTE DES FIGURES

Figure	Page
1.1 Interaction des principaux tissus métaboliquement actifs dans la synthèse endogène et le stockage des lipides.....	5
1.2 Les étapes de la voie de la lipogenèse <i>de novo</i> :	5
1.3 Résumé des principales étapes de la voie de la lipogenèse <i>de novo</i> au niveau des hépatocytes.....	12
1.4 Illustration d'un modèle de l'activation par clivage du facteur SREBP régulé par les stérols.	16
1.5 Les deux principales voies, PI3k/Akt et MAPK, activées par l'insuline	20
1.6 Effets combinés de l'insuline et le l'hormone T3 sur l'activation de l'expression des gènes lipogéniques.....	22
3.1 Effets du C6 sur la synthèse des triglycérides induite par l'insuline et l'hormone T3 dans des hépatocytes.	52
3.2 Effets du C6 sur l'expression des gènes <i>FASN</i> et <i>ACACA</i> induite par l'insuline et l'hormone T3 dans des hépatocytes.....	55
3.3 Effets du C6 sur l'activation des intermédiaires clefs de la voie PI3k/Akt induite par l'insuline.....	58
3.4 Effets du C6 sur l'activité glycoyénique induite par l'insuline en conditions lipotoxiques ou non..	61
3.5 Effet d'un milieu enrichi en C6 sur le contenu cellulaire en acide phosphatidique, comparativement à un milieu enrichi en palmitate.	64

RÉSUMÉ

Quelques études antérieures suggèrent que les acides gras à chaînes moyennes (MCFA) comme le C6 sont connus pour leurs propriétés bénéfiques pour le métabolisme général. Il a notamment été démontré que les MCFA sont capables d'inhiber l'expression des gènes lipogéniques *FASN* et *EM* en présence de l'insuline et de la triiodothyronine (T3). Nous avons proposé d'étudier l'effet de C6 sur l'expression des gènes lipogéniques clefs, sur le rendement lipogénique des hépatocytes et sur leur sensibilité à l'insuline en cas de lipotoxicité. Nous avons proposé comme hypothèses de départ que le C6 provoquerait une modulation de la voie de la lipogenèse *de novo* et une amélioration de la sensibilité à l'insuline au niveau des cellules de la lignée HepG2 et des hépatocytes de rats.

Pour étudier l'impact du C6 sur la synthèse des triglycérides, nous avons incubé des cultures primaires d'hépatocytes de rats 24h avec ou sans insuline, T3 et/ou C6 en présence ou non de [¹⁴C]-Acétate. Après une extraction lipidique et une chromatographie d'affinité, nous avons quantifié le taux d'incorporation du ¹⁴C dans les triglycérides (TG). En parallèle, nous avons évalué par RT-PCR les niveaux d'expression des gènes lipogéniques *FASN* et *ACACA* dans des hépatocytes de rats et des cellules HepG2 soumises aux mêmes conditions.

Pour vérifier l'effet de C6 sur la sensibilité à l'insuline, nous avons incubé les deux types de cellules 24 h en présence ou non d'une dose lipotoxique de palmitate, puis 24 h en présence ou non de C6. Après une stimulation de 15 min à l'insuline nous avons évalué par des immunobuvardages de type Western la phosphorylation des protéines kinases Akt, Erk1/2, p70s6k, mTOR et IRS1. Nous avons également mesuré la synthèse du glycogène par les hépatocytes de rats soumis aux mêmes conditions puis stimulés 4h avec de l'insuline.

Comme attendu, nos résultats montrent que le C6 réduit de 50% la stimulation synergique exercée par l'insuline et T3 sur la synthèse des TG dans les hépatocytes. Il en est de même pour l'effet du C6 sur l'expression des gènes lipogéniques *FASN* et *ACACA*, comme attendu.

Par ailleurs, dans des conditions lipotoxiques, le C6 induit une baisse de la phosphorylation d'Akt associée paradoxalement à une hausse de la phosphorylation de p70s6k, suggérant un effet activateur direct du C6 ou de ses métabolites sur le complexe mTORC1, stimulant l'axe mTORC1/p70s6k et entraînant de cette manière probablement une rétroinhibition de la voie PI3k/Akt. En outre, nous avons démontré que le C6 est capable de doubler la synthèse de glycogène des cellules hépatiques cultivées ou non dans des conditions lipotoxiques, confirmant que le C6 potentialise la sensibilité à l'insuline. L'incubation des cellules avec du C6 n'ayant pas été associée à une hausse de la teneur intracellulaire en acide phosphatidique (un acteur clef dans l'activation nutritionnelle de mTOR), nous avons suggéré que le C6 activait l'axe mTOR/p70s6k en modulant le bilan énergétique cellulaire.

Au final, nous avons réussi à démontrer que le C6 exerçait sur les effets métaboliquement escomptés, en limitant le rendement de la voie de la lipogenèse *de novo* et en améliorant la sensibilité à l'insuline des cellules. Ces données viennent enrichir notre compréhension des mécanismes qui font du C6 et plus généralement des MCFA de bons agents de lutte et de prévention contre les maladies métaboliques. Il serait dès à présent intéressant de voir si les effets bénéfiques du C6 observés au cours de cette étude peuvent améliorer la santé métabolique d'animaux de laboratoires obèses.

Mots clés : Obésité, lipogenèse, résistance à l'insuline, acides gras à chaînes moyennes, voie PI3k/Akt/mTOR, FASN, ACACA.

INTRODUCTION

L'obésité à travers le monde :

L'obésité est maintenant considérée comme une épidémie avec une prévalence mondiale inquiétante (Strable and Ntambi, 2010). Vers la fin des années 2000, le nombre d'adultes en surpoids à travers le monde était estimé à 1,1 milliard et près de 500 millions d'entre eux étaient obèses (OMS, 2013). Le surpoids affecte également 10% des enfants (Haslam and James, 2005). Il se trouve même que 44% des cas mondiaux de diabète, 23% des accidents ischémiques et jusqu'à 41% de certains types de cancer sont associés à l'obésité et à la surcharge pondérale (OMS, 2013). Une telle globalisation de l'obésité et de ses conséquences sur la santé humaine (comme les diabètes et les stéatoses hépatiques non alcooliques) est aujourd'hui clairement imputable à la généralisation d'un régime alimentaire de plus en plus riche en carbohydrates et en lipides, notamment en acides gras saturés à longues chaînes (Strable and Ntambi, 2010, Manco et al., 2004, Akpa et al., 2010). Si le traitement et la prévention de l'obésité s'imposent, ils passent d'abord par une bonne compréhension des mécanismes biologiques, s'exerçant tant au niveau physiologique que moléculaire, favorables au développement de l'obésité à l'échelle individuelle. Les acides gras saturés issus de l'alimentation, dont le plus abondant est l'acide stéarique (C18:0), de même que les glucides, se comportent comme des inducteurs de la lipogenèse et du stockage des graisses (Sampath et al, 2007; Manco et al, 2004). Leur accumulation excessive accroît les risques de troubles métaboliques (Sampath et al., 2007).

Vue générale des désordres métaboliques induisant l'obésité :

La lipogenèse *de novo* (DNL) est une voie métabolique hautement régulée qui, chez l'Homme, est essentiellement opérée par les hépatocytes et à une moindre échelle par les adipocytes (Strable et Ntambi, 2010 ; Akpa et al, 2010). La DNL permet de convertir en acides gras, les carbohydrates apportés en excès par rapport aux besoins caloriques de l'organisme et par rapport aux capacités de stockage sous forme de glycogène. Les acides gras produits sont soit stockés au niveau hépatique sous forme de triglycérides, soit véhiculés via les VLDL (*Very Low Density Lipoproteins*) vers d'autres sites de stockage comme les tissus adipeux ou les muscles, en guise de réserves d'énergie (Strable and Ntambi, 2010, Nakamura et al., 2004, McDevitt et al., 2001). Les acides gras peuvent aussi intégrer d'autres voies métaboliques pour entrer dans la composition de divers constituants de l'organisme (Nakamura et al., 2004). Étant donné le rôle prépondérant de la DNL dans la formation et l'accumulation des graisses, sa stimulation induite par une surconsommation de carbohydrates et d'acides gras saturés contribue grandement au développement de l'obésité (Strable et Ntambi, 2010 ; McDevitt et al, 2001). Il apparaît donc que la modulation négative de la voie de la DNL constitue une cible thérapeutique de choix pour le traitement et la prévention de l'obésité (Strable et Ntambi, 2010).

Les Acides gras à chaîne moyenne (*Medium Chain Fatty Acids*) :

Dans ce contexte, la littérature des trente dernières années foisonne de stratégies biochimiques et pharmacologiques visant à inhiber, au moins partiellement, certaines des étapes clefs de la lipogenèse décrites en détail plus bas (Beynen et al., 1981a, Beynen et al., 1981b). Ces dernières décennies, ce sont notamment les acides gras à chaînes moyennes (MCFA), des composés naturels connus depuis plus de cinquante ans pour leurs effets métaboliquement bénéfiques, qui ont suscité l'intérêt des chercheurs pour leur capacité à inhiber partiellement certaines composantes clefs de la lipogenèse

sans compromettre l'apport lipidique vital (Roncero and Goodridge, 1992, St-Onge and Jones, 2002). Des études antérieures ont déjà démontré par exemple que l'hexanoate (C6 :0), un acide gras à chaîne moyenne, est capable d'exercer un effet inhibiteur sur l'expression et l'activité enzymatique de la synthétase des acides gras (FASN) et de l'enzyme malique (EM), deux enzymes clés de la lipogenèse (Akpa et al, 2010, Roncero and Goodridge, 1992). L'effet inhibiteur exercé par l'hexanoate sur FAS a été observé même en présence de l'insuline et de l'hormone thyroïdienne Triiodothyronine (T3), deux hormones activatrices de l'expression de FASN et dont les concentrations sériques sont les plus élevées en conditions postprandiales (Akpa et al., 2010, Radenne et al., 2008).

Objectifs d'études généraux :

A la lumière de ces acquis, la présente étude se propose d'étendre à l'ensemble des gènes clés de la lipogenèse l'étude de l'effet de l'hexanoate. Étant donné que ces gènes sont au même titre que la FASN et l'EM régulés positivement par l'insuline et la T3, il devient alors nécessaire de se questionner sur la capacité de l'hexanoate à moduler négativement et globalement la lipogenèse. Le cas échéant, il pourrait s'en suivre une inhibition efficace de l'accumulation hépatique des gouttelettes lipidiques, et du stockage des graisses dans le tissu adipeux, confortant ainsi l'usage de l'hexanoate comme une piste intéressante dans la prévention puis le traitement de l'obésité et de ses complications métaboliques, telles que les stéatoses hépatiques non alcooliques (NASH), le syndrome métabolique les diabètes non insulino dépendants et les inflammations locales et systémiques.

CHAPITRE I

ÉTAT DES CONNAISSANCES

1.1 L'anabolisme des lipides :

1.1.1 Les fonctions biologiques de la lipogenèse *de novo* (DNL) :

La synthèse des acides gras endogènes, ou la voie de la lipogenèse *de novo* (DNL), est un processus anabolique cellulaire régi par différents niveaux de régulation et qui consiste à convertir, en lipides, les carbohydrates assimilés en excès (Strable et Ntmabi, 2010 ; Clarke et Nakamura, 2004). Il s'agit essentiellement de glucides apportés par la diète et qui dépassent les besoins calorifiques immédiats de l'organisme ainsi que les capacités de stockage sous forme de glycogène. Les lipides ainsi produits peuvent alors être stockés sous forme de triacylglycérides en guise de réserves d'énergie avant d'être empaquetés dans les gouttelettes lipidiques puis véhiculés via des complexes lipoprotéiques, comme les lipoprotéines à très faibles densités (VLDL), vers les tissus métaboliquement actifs comme le tissu adipeux et les muscles, comme l'illustre la figure 1 ci-dessous (Rui, 2014, Strable and Ntambi, 2010).

Outre le stockage d'énergie hautement concentrée, les lipides produits au terme de la lipogenèse *de novo* sont mobilisés pour diverses autres fonctions biologiques. Les triacylglycérides, les diacylglycérides, et les acides lysophosphatidiques. Ces derniers sont partiellement convertis en acides phosphatidiques servant de précurseurs à la synthèse des phospholipides, principaux constituants des membranes cellulaires (Foster et al., 2014). Ils jouent également d'autres rôles structurels notamment dans le processus de myélinisation des axones neuronaux effectué par les oligodendrocytes du système nerveux central et les cellules de Schwann du système nerveux périphérique (Nave and Werner, 2014) Les lipides endogènes participent par ailleurs au revêtement de certaines surfaces mucosales et se retrouvent même dans la composition du lait maternel (Clarke

et Nakamura, 2004). De manière ubiquitaire, la voie de la lipogenèse *de novo* est également responsable de la synthèse du cholestérol et des esters de cholestérol (Harvey et Ferrier, 2010 ; Rui, 2014). Les lipides endogènes remplissent donc des fonctions énergétiques, structurelles et endocrines. S'inscrivant dans la thématique de recherche reliée à l'obésité, la présente étude se concentre principalement sur la fonction énergétique des lipides endogènes.

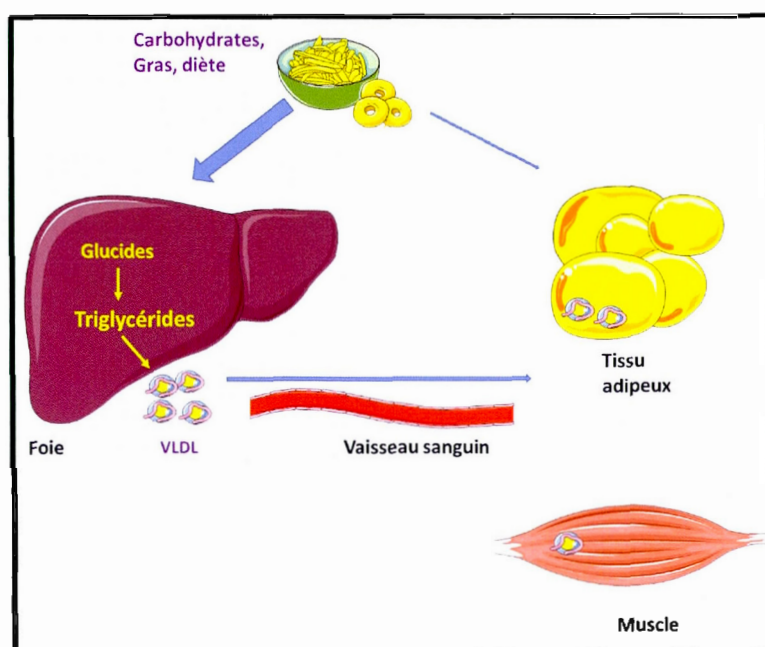


Figure 1.1 Interaction des principaux tissus métaboliquement actifs dans la synthèse endogène et le stockage des lipides. Les abréviations utilisées dans la figure correspondent à celles du texte. Les triglycérides, issus de la conversion des glucides et des lipides de la diète, sont en partie véhiculés par les VLDL via la circulation sanguine vers les organes réserves comme les muscles et les hépatocytes. (Modifié depuis Strable et Ntambi, 2010).

1.1.2 Les étapes de la voie de la lipogenèse *de novo* :

La lipogenèse *de novo* implique essentiellement la condensation des molécules d'acétate – produites par la dégradation du pyruvate lors du cycle de Krebs – en acides gras saturés (SFA). La lipogenèse *de novo* peut également impliquer la transformation

directe des lipides issus de la diète, comme l'acide linoléique (C18 :2), l'acide stéarique (C18:0), l'acide oléique (C18:1n-9), le palmitate (C16:0) ou le palmitoléate (C16:1n-7), en *acides gras* à longues chaînes (jusqu'à 22 atomes de carbone) saturés, monoinsaturés ou polyinsaturés (Clarke et Nakamura, 2004 ; Strable et Ntmabi, 2010 ; Lodhi et al, 2011). Le principal siège de la lipogenèse *de novo*, chez l'Homme – et chez d'autres animaux comme les oiseaux – est le foie, tandis que cette voie anabolique est assurée aussi bien par le foie que le tissu adipeux chez les rongeurs. Néanmoins, du fait de la diversité susmentionnée des rôles joués par les lipides, les autres tissus de l'organisme assurent presque tous une activité lipogénique plus ou moins importante (Strable et Ntmabi, 2010; Akpa et al, 2010 ; Clarke et Nakamura, 2004 ; Rui, 2014).

Un des principaux précurseurs de la voie de la lipogenèse *de novo* est le pyruvate, un produit de la glycolyse qui est constamment régénéré par le cycle de Krebs (Strable et Ntmabi, 2010 ; Clarke et Nakamura, 2004). Les hépatocytes sont les principales cellules métaboliquement actives du foie. Dans des conditions physiologiques normales et dans les conditions postprandiales où la concentration sanguine de glucose excède 5mM, le transport du glucose dans les hépatocytes depuis le milieu physiologique est assuré par les protéines transmembranaires GLUT2. Le glucose intracellulaire est alors phosphorylé par l'enzyme glucokinase en glucose-6-phosphate (G6P) qui sert de précurseur à la synthèse de glycogène et à la production du pyruvate via les étapes de la glycolyse (Harvey et Ferrier, 2010 ; Rui, 2014 ; Ameer et al, 2014).

1.1.2.1 Source et synthèse des précurseurs de la lipogenèse *de novo* :

Le pyruvate produit par la glycolyse est d'abord converti par l'enzyme pyruvate déshydrogénase en acétyl-CoA, dans le cytosol. Dans la mitochondrie, huit réactions en série, permettant la transformation de l'acétyl-CoA en citrate puis sa décarboxylation oxydative, aboutissent à la production d'énergie sous forme d'ATP et à la régénération du pouvoir réducteur sous forme de NADH et de FADH₂. Au terme de cette série de

réactions qui définissent le cycle de Krebs (ou le cycle de l'acide tricarboxylique), du citrate est continuellement régénéré. En conditions normales ou lorsque le bilan énergétique cellulaire est positif, le citrate en grande quantité est déplacé vers le milieu cytosolique où il est clivé par l'enzyme ACLY (ATP-citrate lyase) en oxaloacétate et en acétyl-CoA cytosoliques extramitochondriaux (Strable et Ntmabi, 2010 ; Clarke et Nakamura, 2004 ; Lodhi et al, 2011 ; Harvey et Ferrier, 2010). La molécule d'acétyl-CoA, à des taux élevés dans le cytosol, sert alors de précurseur à la réaction de la *lipogenèse de novo* dont les enzymes clefs sont désignées comme les ''enzymes lipogéniques''. Il s'agit, pour les principales et dans leur ordre d'intervention, des enzymes ACACA (Acetyl-CoA carboxylase alpha), FASN (Fatty acid synthase), SCD-1 (Δ -9-Stearoyl-CoA desaturase, de type 1) et de l'ELOVL6 (Elongation of long-chain fatty acids family member 6) (Strable et Ntmabi, 2010 ; Clarke et Nakamura, 2004 ; Lodhi et al, 2011 ; Rui, 2014). Ces enzymes catalysent la synthèse des acides gras libres au niveau des cellules métaboliquement actives, dont principalement les hépatocytes.

1.1.2.2 La biosynthèse des divers types d'acides gras libres :

- La synthèse du malonyl-CoA :

La première phase de la lipogenèse proprement dite fait intervenir l'enzyme ACACA dont il existe deux isoformes ubiquitaires codés par deux gènes distincts regroupés sous l'appellation *ACACA* : l'enzyme ACACA1 et l'enzyme ACACA2. Exprimée essentiellement par les hépatocytes et le tissu adipeux, l'enzyme ACACA1 est présente dans le cytosol où elle joue un rôle lipogénique tandis que l'enzyme ACACA2, davantage exprimée par les myocytes, est plutôt associée à la membrane mitochondriale où elle participe à la réaction catabolique de la β -oxydation. Dans ce qui suit, il sera question de l'isoforme ACACA1 (ACACA). L'enzyme ACACA requiert la présence de ses deux substrats principaux pour être active, l'acétyl-CoA synthétisée de la manière décrite plus haut, et du HCO_3^- qui sert de donneur de carbone. L'enzyme ACACA

catalyse une réaction de carboxylation qui, en oxydant le HCO_3^- et de l'ATP en ADP+Pi, transforme l'acétyl-CoA en malonyl-CoA, une molécule à deux atomes de carbone. Cette dernière devient alors la fournisseuse des paires de carbones nécessaires à l'élaboration séquentielle subséquente des acides gras à longues chaînes (Strable et Ntmabi, 2010 ; Clarke et Nakamura, 2004 ; Lodhi et al, 2011 ; Rui , 2014 ; Ameer et al, 2014).

-La biosynthèse des acides gras libres saturés à longues chaînes :

La phase de la lipogenèse *de novo* qui consiste à synthétiser du palmitate, un acide gras saturé à 16 atomes de carbone, est opérée par le complexe multi-enzymatique de la FASN. Cette dernière est un homodimère d'un poids moléculaire de 260 KDa. Chez les organismes supérieurs, l'enzyme multifonctionnelle FASN de type 1 bien qu'ubiquitaire reste davantage exprimée dans les tissus métaboliquement actifs comme le foie et le tissu adipeux. Les sept groupes catalytiques actifs distincts de l'enzyme assurent l'addition séquentielle des paires de carbones fournies par le malonyl-CoA dans une série de réactions qui consistent à transformer 7 molécules de malonyl-CoA et une molécule d'acétyl-CoA, en palmitate. Ces réactions réductrices requièrent l'oxydation de 14 molécules de NADPH (Lodhi et al., 2011, Chirala et al., 2003, Wakil, 1989). La synthèse de palmitate catalysée par la FASN se fait par l'agencement séquentiel des briques à deux atomes de carbone fournies sous la forme de malonyl-CoA, au cours d'une série complexe de réactions (avec 30 intermédiaires acylés) qui peuvent se résumer en trois grandes étapes : l'étape de recrutement des deux substrats acétyl-CoA et malonyl-CoA en vue de leur condensation, l'étape répétitive de réduction de la chaîne d'acide gras permettant son allongement séquentiel, puis l'étape de libération de l'acide gras libre achevé à 16 atomes de carbone. Les trois étapes sont réalisées simultanément et en série par trois domaines distincts présents sur chacune des deux sous-unités de l'enzyme FASN. (Wakil, 1989, Radenne, 2008 ; Lodhi et al, 2011).

Une fois la première phase de la lipogenèse terminée, les étapes qui suivent concernent davantage les modifications apportées au « produit brut » qui est le palmitate.

-L'élongation et la désaturation des acides gras endogènes :

Étant donné que les lipides destinés à des fonctions structurelles ou endocrines sont en grande partie des chaînes d'acides gras à 18 atomes de carbone ou plus, une partie du palmitate produit par FASN sert de substrat à l'enzyme ELOVL6 (*Elongase of long-chain fatty acids family member 6*). Cette enzyme ubiquitaire identifiée en 2001, soit relativement récemment (Moon et al., 2001), est caractérisée comme étant une enzyme microsomale associée à la membrane du réticulum endoplasmique et dont la fonction consiste à rallonger les chaînes d'acides gras par l'ajout de deux atomes de carbone à leur fonction acide carboxylique. Aussi bien les chaînes acylées de palmitate (C16:0) produites lors de la lipogenèse que celles issues de la diète, peuvent être transformées par l'enzyme ELOVL6 en stéarate (C18:0). Par ailleurs, ELOVL6 permet l'élongation des chaînes d'acides gras saturés et monoinsaturés longues de 12, 14 et 16 atomes de carbone fournies essentiellement par la diète (Matsuzaka et al., 2012, Moon et al., 2001, Strable and Ntambi, 2010). Le palmitate et le stéarate ainsi générés peuvent alors être mobilisés pour des fonctions structurelles, endocriniennes et énergétiques, suite à l'ultime étape de la lipogenèse *de novo*, celle de la désaturation des acides gras.

Les acides gras à longues chaînes monoinsaturées entrent principalement dans la composition des triglycérides et des bicouches phospholipidiques où ils participent respectivement au stockage de l'énergie et à la structure cellulaire. La désaturation des acides gras, au terme de la lipogenèse *de novo*, est catalysée par les enzymes SCD (Stéaroyl CoA désaturases) dont il existe deux isoformes chez l'humain : l'isoforme SCD-5 exprimé essentiellement dans le cerveau et le pancréas, et l'isoforme SCD-1 ubiquitaire, davantage exprimé par les hépatocytes. C'est l'isoforme SCD-1 qui est le plus impliqué dans l'anabolisme des lipides. Il s'agit d'une enzyme d'un poids

moléculaire de 40 KDa ancrée dans la membrane du réticulum endoplasmique à la manière de l'ELOVL6 (Strittmatter et al., 1974, Strable and Ntambi, 2010, Mauvoisin and Mounier, 2011, Miyazaki et al., 2007, Sampath et al., 2007). SCD-1 catalyse la monoinsaturation, c'est-à-dire l'incorporation d'une seule double liaison covalente, en position Δ -9 (neuvième atome de carbone numéroté à partir de l'atome de carbone de la fonction acide carboxylique) des acides gras découlant de la lipogenèse *de novo*. Cette réaction de réduction requiert, outre la présence de l'enzyme SCD-1, la présence du pouvoir réducteur NADH, de la stéaroyl-Coenzyme A, de l'oxygène, des acides gras à longue chaîne saturés (préférentiellement du palmitate ou du stéarate), de l'enzyme cytochrome b_5 réductase, et du cytochrome b_5 en guise de premier donneur d'électron. Le palmitate synthétisé par l'enzyme FAS ainsi que le stéarate synthétisé par ELOVL6 sont les principaux substrats de l'enzyme SCD-1 qui les transforme respectivement en palmitoléate (C16:1n-7) et en oléate (C18:1n-9). (Strittmatter et al., 1974 ; Strable et Ntambi, 2010 ; Mauvoisin et Mounier, 2011 ; Ntambi, 2013).

1.1.2.3 L'estérification puis le stockage des réserves lipidiques néoformées :

Au niveau de la membrane du réticulum endoplasmique, les acides gras libres nouvellement synthétisés sont convertis par des réactions d'estérification en acides gras neutres pour générer des triacylglycérols en guise de réserves d'énergie mais également des diacylglycérols ou encore des acides phosphatidiques qui servent de précurseurs à la synthèse des phospholipides à fonctions structurales ou transductrices de signal (Coleman and Mashek, 2011, Kohlwein et al., 2013, Guo et al., 2009). Dans les hépatocytes et les adipocytes, la production des acides gras estérifiés nécessite la présence du glycérol-3-phosphate libre qui découle principalement de la dégradation du dihydroxyacétone phosphate (DHAP) lors de la glycolyse mais aussi du processus de glycéronéogenèse à partir du pyruvate, du malate ou d'autres intermédiaires du cycle de Krebs (Nye et al., 2008). Sous l'action de l'enzyme glycérol-3-phosphate acyltransférase

(GPAT) un groupement glycérol-3-phosphate libre est estérifié en position sn-1 avec un acide gras libre acylé pour générer une molécule d'acide lysophosphatidique. Sur une molécule de glycérol les positions sn correspondent aux sites capables d'établir une liaison avec une chaîne d'acide gras libre acylé. L'acide lysophosphatidique, sous l'action de l'enzyme acylglycérophosphate acyltransférase, est estérifié en position sn-2 avec un autre acide gras libre acylé pour générer de l'acide phosphatidique. À ce stade, les acides gras estérifiés destinés à des rôles de stockage d'énergie sont départis de leur groupement phosphate. Cette réaction d'hydrolyse est catalysée par la phosphohydrolase de l'acide phosphatidique (PAP). L'acide phosphatidique est alors transformé en diacylglycérol dont une dernière estérification en position sn-3, catalysée par l'enzyme diacylglycérol acyltransférase (DGAT), avec un acide gras libre acylé, génère du triacylglycérol. (Coleman and Mashek, 2011, Athenstaedt and Daum, 2006, Foster et al., 2014, Nye et al., 2008).

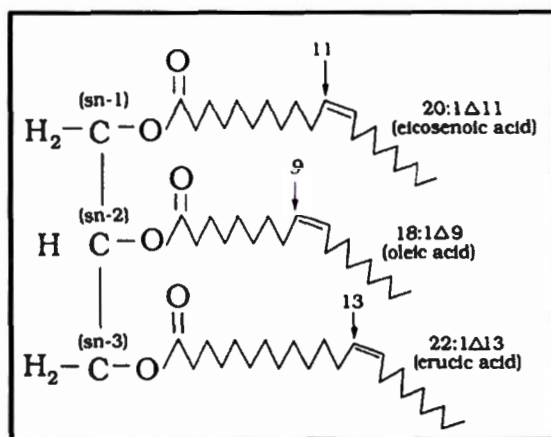


Figure 1.2 Exemple d'une molécule de triacylglycérol (triglycéride). Dans cet exemple, une chaîne d'acide érucique, une chaîne d'acide oléique et une chaîne d'acide éicosénoïque (trois types d'acides gras monoinsaturés) sont estérifiées avec un groupement glycérol respectivement en positions sn-3, sn-2 et sn-1. (Tiré du site www.hort.purdue.edu).

De nature insolubles en milieu aqueux (qu'il s'agisse du milieu cytosolique ou du milieu sanguin) les triacylglycérols produits par les hépatocytes et les adipocytes sont d'abord

accumulés dans les gouttelettes lipidiques dans les cellules. Par la suite ils sont en grande partie véhiculés par des transporteurs lipoprotéiques solubles, comme les lipoprotéines de très faibles densités (VLDL), vers les principaux organes de stockage dont le tissu adipeux et les muscles. Les stocks de triacylglycérols sont les plus importantes réserves énergétiques de l'organisme et ils représentent plus de 90% du contenu du tissu adipeux blanc (Strable and Ntambi, 2010, Coleman and Mashek, 2011, Harris et al., 2011). La figure 3 présentée dans ce qui suit synthétise de manière sommaire l'essentiel des étapes de la voie de la lipogenèse *de novo*, depuis l'assimilation des carbohydrates issus de la diète, jusqu'à la formation des triglycérides et leur stockage dans les gouttelettes lipidiques ou les VLDL.

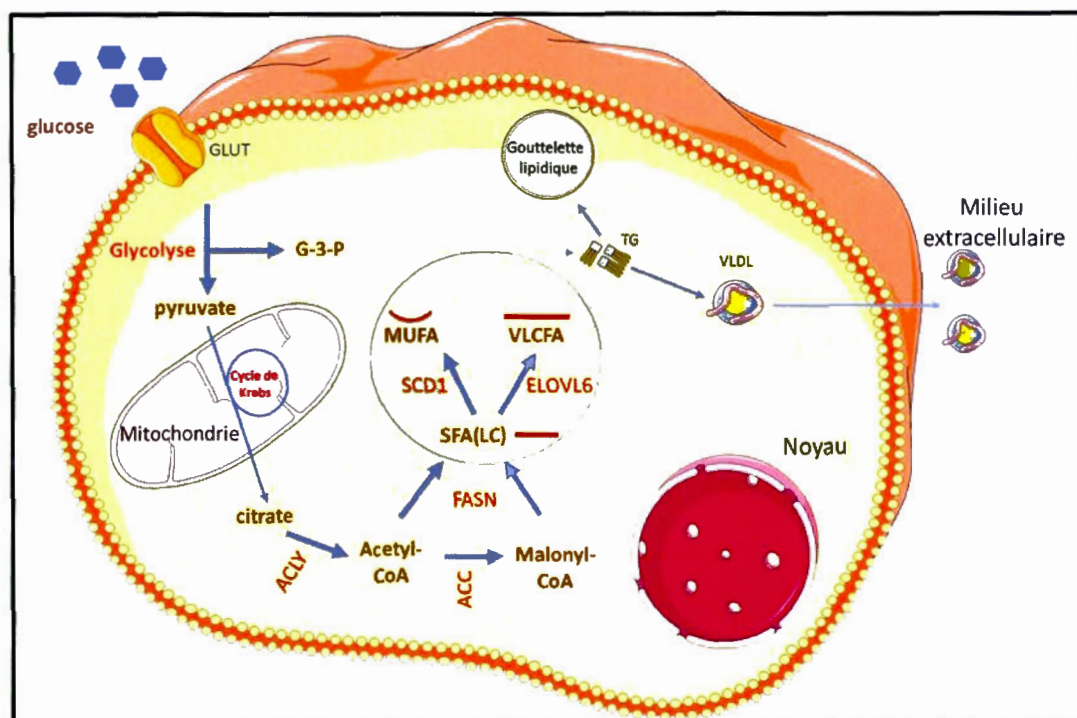


Figure 1.3 Résumé des principales étapes de la voie de la lipogenèse *de novo* au niveau des hépatocytes. Les abréviations utilisées dans la figure correspondent à celles du texte. Les enzymes lipogéniques sont identifiées en rouge (ACC correspond à ACACA) et en noir, les principales molécules de la voie.

1.1.3 La lipogenèse *de novo*, une voie métabolique hautement régulée :

L'homéostasie du métabolisme des lipides, dans des conditions physiologiques normales, est assurée par un équilibre constant entre la lipogenèse et la dégradation des lipides via la lipolyse et la β -oxydation. Cette homéostasie se traduit en partie par le fait que la voie de la lipogenèse *de novo* est hautement régulée aussi bien par des facteurs modulateurs de la transcription, que par les hormones et les nutriments servant principalement à la synthèse des acides gras. De ce fait, la lipogenèse *de novo* est plus ou moins active dépendamment de la disponibilité des carbohydrates, des acides aminés ou des acides gras exogènes. Dans les conditions postprandiales, les glucides et les divers acides gras exogènes saturés à longues chaînes activent la lipogenèse *de novo*, tandis que dans d'autres conditions nutritionnelles comme le jeûne et en présence d'autres nutriments à l'instar des acides gras exogènes polyinsaturés, la lipogenèse est inhibée (Kersten, 2001, Ameer et al., 2014).

1.1.3.1 Les principaux facteurs de transcription régulant la lipogenèse *de novo* :

L'expression des gènes lipogéniques clefs est régulée essentiellement au niveau transcriptionnel par les principaux facteurs de transcription appartenant aux familles des LXR, des RXR, des SREBP et des ChREBP (Strable et Ntambi, 2010).

-Fonctions du facteur de transcription LXR :

Les facteurs LXR (Liver X receptor) sont des récepteurs nucléaires qui se présentent sous deux isoformes : LXR α (codé par le gène NR1H3) et LXR β (codé par le gène NR1H2). Véritables senseurs de l'état nutritionnel de la cellule, les LXR jouent un rôle

prépondérant dans la régulation de la DNL et du métabolisme du cholestérol. Les LXR sont les récepteurs naturels des oxydes de stérol ainsi que du glucose lui-même. Ces évidences sont basées sur plusieurs études qui ont notamment démontré que l'administration d'agonistes des LXR chez des souris $LXR\alpha/\beta(-/-)$ ainsi que leurs surexpression chez des organismes de type sauvage étaient associées à une hausse de l'expression des gènes lipogéniques et de la triglycéridémie (Schultz et al., 2000). Une fois activés, les LXR se lient au RXR (Retinoid X receptor) pour former le complexe LXR-RXR qui se fixe sur les promoteurs des gènes FAS, ACACA, SCD-1, ELOVL6 et GPAT, activant leurs expressions. (Schultz et al., 2000, Strable and Ntambi, 2010, Chen et al., 2004). Outre leur action génomique directe, les LXR participent en plus indirectement à la stimulation de la lipogenèse *de novo* car ils activent au niveau transcriptionnel l'expression du gène codant pour le facteur de transcription SREBP-1c, un régulateur central de la lipogenèse (Postic and Girard, 2008).

-Fonctions de la famille des facteurs de transcription SREBP :

Les membres de la famille des SREBP (Sterol regulatory element binding protein) représentent le principal pivot de la régulation de l'expression des gènes lipogéniques, principalement l'isoforme SREBP-1c. Ce sont des facteurs de transcription qui agissent de concert avec les LXR. Les SREBP sont classés dans la catégorie des protéines organisées en double-hélices à fermeture à glissière à leucine. Sous leur forme native, les SREBP sont des protéines de 125 KDa ancrées dans la membrane du réticulum endoplasmique. Elles se déclinent sous trois isoformes, SREBP-1a, SREBP-1c et SREBP-2. SREBP-1a et SREBP-1c sont issus de l'épissage alternatif d'un même gène localisé sur le chromosome 22, tandis que SREBP-2 est codé par un autre gène localisé sur le chromosome 19. Si SREBP-2 est davantage impliqué dans la régulation des gènes de la cholestérogenèse, SREBP-1a et SREBP-1c induisent, plus globalement, l'expression à la fois des gènes de la cholestérogenèse et ceux de la lipogenèse et de

l'anabolisme des triglycérides. Cela inclut les gènes *ACLY*, *ACACA*, *FASN*, *ELOVL6* et *DGAT*. Des trois isoformes, le plus exprimé au niveau hépatique, aussi bien chez les humains que les rongeurs, est le SREBP-1c (Chen et al, 2004 ; Ameer et al, 2014 ; Strable et Ntambi, 2010 ; Horton et al, 2002). Au niveau des hépatocytes, outre l'activation directe des gènes lipogéniques, SREBP-1c induit la lipogenèse *de novo* en stimulant l'expression des gènes codant pour l'enzyme malique (EM), la glucose-6-phosphate déshydrogénase (G-6-PD) et la 6-phosphogluconate déshydrogénase (PGDH), qui participent toutes les trois à la production du NADPH indispensable aux réactions anaboliques lipogéniques décrites plus haut (Shimomura, 1998, Horton et al., 2002). Tout comme le facteur LXR, SREBP-1c est un senseur de l'état nutritionnel cellulaire. Des concentrations intracellulaires élevées en carbohydrates ou en lipides, ainsi que la chute des taux de stérols, sont connues pour activer à elles seules l'expression des SREBP, en dehors des activations hormonales décrites plus bas. La protéine membranaire SCAP (SREBP cleavage-activating protein) ancrée au réticulum endoplasmique interagit physiquement avec SREBP. Lors de la chute des réserves de stérols, SCAP escorte SREBP vers l'appareil de Golgi où il subit un clivage par la protéine INSIG qui libère son domaine N-terminal glycosylé structuré en double hélice à fermeture à glissière à leucine. Ce domaine migre alors dans le noyau pour se lier aux séquences des régions SRE (Sterol response elements) situées dans les promoteurs des gènes lipogéniques. Dans les conditions opposées où les taux de stérols sont élevés et ceux des carbohydrates et des lipides relativement bas, l'expression des SREBP est inhibée. Par ailleurs, plusieurs études ont mis en évidence une interdépendance entre l'activité des LXR et celle des SREBP qui augmentent aussi la production des RXR. (Chen et al, 2004 ; Ameer et al, 2014 ; Strable et Ntambi, 2010). La figure 4 présentée à la suite le clivage activateur de la protéine SREBP médié par SCAP.

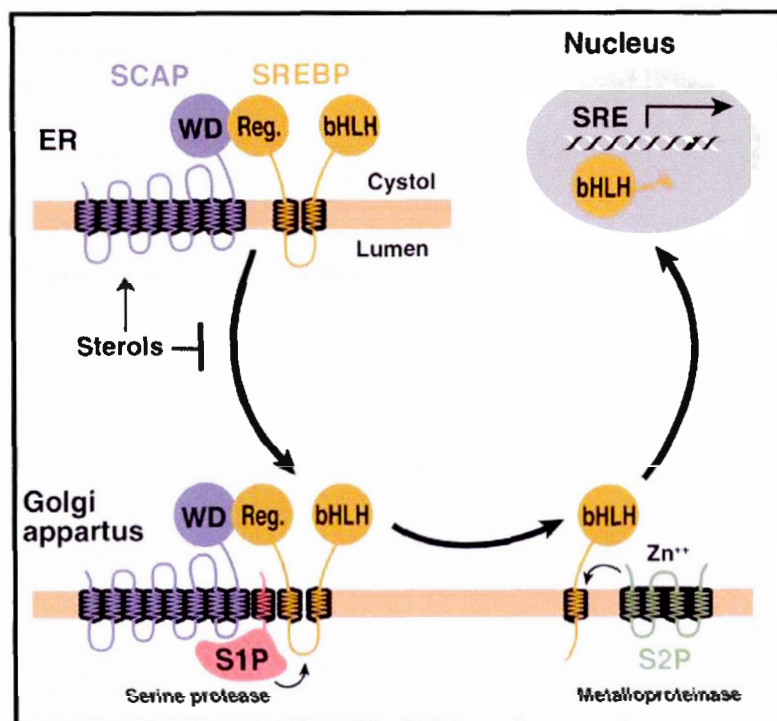


Figure 1.4 Illustration d'un modèle de l'activation par clivage du facteur SREBP régulé par les stérols. Une déplétion des stérols cellulaires la protéine SCAP escorte la protéine native SREBP depuis le RE vers l'appareil de Golgi où elle est clivée en série par la protéase S1P et par la métalloprotéinase S2P. Le domaine bHLH-Zip libéré migre alors vers le noyau pour interagir avec les SRE. En cas de hausse de la teneur en stérols intracellulaires, le trafic vers l'appareil de Golgi médié par SCAP de la protéine native SREBP est inhibé '' (Horton et al, 2002).

- Les Fonctions du facteur de transcription ChREBP :

Autre acteur non négligeable dans la régulation du métabolisme des lipides, le facteur ChREBP (carbohydrate responsive element binding protein), d'un poids moléculaire de 95KDa, est une protéine qui présente plusieurs domaines actifs dont deux organisés en double-hélices à fermeture à glissière à leucine, à la manière du domaine N-terminal d'une protéine de type SREBP. Hautement exprimé dans le foie, les reins et l'intestin, le facteur ChREBP est lui aussi décrit comme un senseur de l'état nutritionnel de la cellule (Postic et al, 2007 ; Strable et Ntambi, 2010 ; Ameer et al, 2014). Positivement

régulé au niveau transcriptionnel par les LXR, le facteur ChREBP est surtout activé lors d'un apport élevé en glucose. En effet, le xylulose-5-phosphate, un intermédiaire de la voie catabolique des pentoses phosphate, active la protéine phosphatase-2A (PP2A). Celle-ci catalyse alors deux étapes successives de déphosphorylation séquentielles du ChREBP : une première déphosphorylation sur le résidu Ser196 pour permettre la translocation nucléaire du ChREBP, puis une seconde sur le résidu Thr666 qui a pour effet d'activer complètement le facteur ChREBP qui peut alors se lier aux séquences promotrices ChoREs (Glucose-or carbohydrate-response elements). Celles-ci gouvernent principalement l'expression des gènes codant pour des enzymes glycolytiques et lipogéniques dont ceux de la *L-PK* (*Liver pyruvate kinase*), l'*ACACA*, la *FASN*, la *SCD-1*, et la *GPAT*. (Postic et al, 2007 ; Strable et Ntambi, 2010 ; Ameer et al, 2014).

1.1.3.2 La régulation hormonale et nutritionnelle de la lipogenèse *de novo* :

-Les principales hormones régulatrices de la lipogenèse :

Alors que la condition de jeûne est associée à une baisse des concentrations sériques en insuline, en hormones thyroïdiennes (TH) T3 (triiodothyronine) et T4 (tétraïodothyronine) et en leptine, contrebalancées par une hausse des concentrations en glucagon et en GH (hormone de croissance), les conditions postprandiales induisent l'effet inverse. Toutes Ces hormones jouent un rôle clef dans l'homéostasie du métabolisme des lipides (Kersten, 2001).

○ L'insuline :

Sécritée par les cellules- β du pancréas, l'insuline est sans doute l'hormone qui exerce la plus grande influence sur la régulation de la lipogenèse. Au niveau du foie, du tissu adipeux et des muscles, l'insuline active la lipogenèse de deux manières. Elle favorise l'internalisation du glucose dans les cellules par les transporteurs GLUT d'une part, et d'autre part elle stimule l'expression des gènes glycolytiques et des gènes lipogéniques (Kersten, 2001, Capeau, 2003). Ces réponses cellulaires résultent de la transduction du signal insulinémique qui débute par la liaison de l'hormone au récepteur IR (Insulin receptor) à activité tyrosine kinase. L'autophosphorylation en résidu Tyr960 de l'IR permet alors de recruter les protéines IRS1/2 (Insulin receptor substrat 1 and 2) puis de les activer par phosphorylation. Les IRS1/2 permettent le recrutement sur la face cytosolique de la membrane plasmique de l'unité régulatrice de la PI3k, la p85, résultant en l'activation de la voie PI3k/Akt/mTOR. L'activation de la PI3k catalyse la conversion par phosphorylation des PIP₂ en PIP₃ membranaires qui, à leur tour, peuvent recruter et phosphoryler les protéines PDK1/2. PIP₃ liera par la suite la protéine Akt (PKB) permettant à PDK1 et PDK2 de la phosphoryler respectivement sur ses résidus Thr308 et Ser473 (Matsuda et al, 2013; Capeau, 2003). Plusieurs cibles en aval d'Akt seront alors activées, incluant les complexes mTORC1 et mTORC2 via l'inhibition des complexes TSC1/2 (Matsuda et al., 2013, Laplante and Sabatini, 2010, Capeau, 2003). Par un mécanisme encore mal connu, l'activation de mTORC1 conduit à l'activation du facteur de transcription SREBP-1c, tant au niveau transcriptionnel que post-traductionnel, stimulant par voie de conséquent la lipogenèse. Le facteur p70s6k (ou p70rsk), un inducteur de la protéosynthèse générale, est une des autres cibles positivement et directement régulées par mTORC1. Le complexe mTORC2 gouverne essentiellement le remodelage du cytosquelette tout en exerçant un rétrocontrôle positif sur la voie des PI3k/Akt/mTOR en phosphorylant continuellement Akt sur le résidu Ser473 (Matsuda et al, 2013 ; Capeau, 2003 ; Laplante et Sabatini, 2010).

En parallèle, l'activation de la voie des PI3k/Akt/mTOR induit la stimulation de la voie dépendante de PKC ζ / λ . L'activation de cette voie aboutit à la translocation des transporteurs GLUT4 du réseau Trans-Golgien vers la surface de la cellule. Cette translocation est nécessaire à la captation du glucose extracellulaire qui sert alors de substrat à la lipogenèse *de novo*. (Matsuda et al, 2013 ; Capeau, 2003 ; Laplante et Sabatini, 2010).

Par ailleurs, les IRS1/2 activés en amont recrutent et activent le complexe Ras/Raf menant à la stimulation de la voie Erk_{1/2}/MAPk (Matsuda et al, 2013 ; Capeau, 2003). La voie des MAPK activée par l'insuline est surtout impliquée dans la croissance et la prolifération cellulaire. Nous avons cependant prouvé dans une étude antérieure que cette voie était aussi impliquée dans l'activation non génomique de l'enzyme lipogénique FASN induite par l'insuline et l'hormone thyroïdienne T3 (Radenne et al., 2008). La figure 5 illustre les principaux éléments de la voie PI3k/Akt et ceux de la voie des MAPK, toutes deux activées par le signal insulinémique.

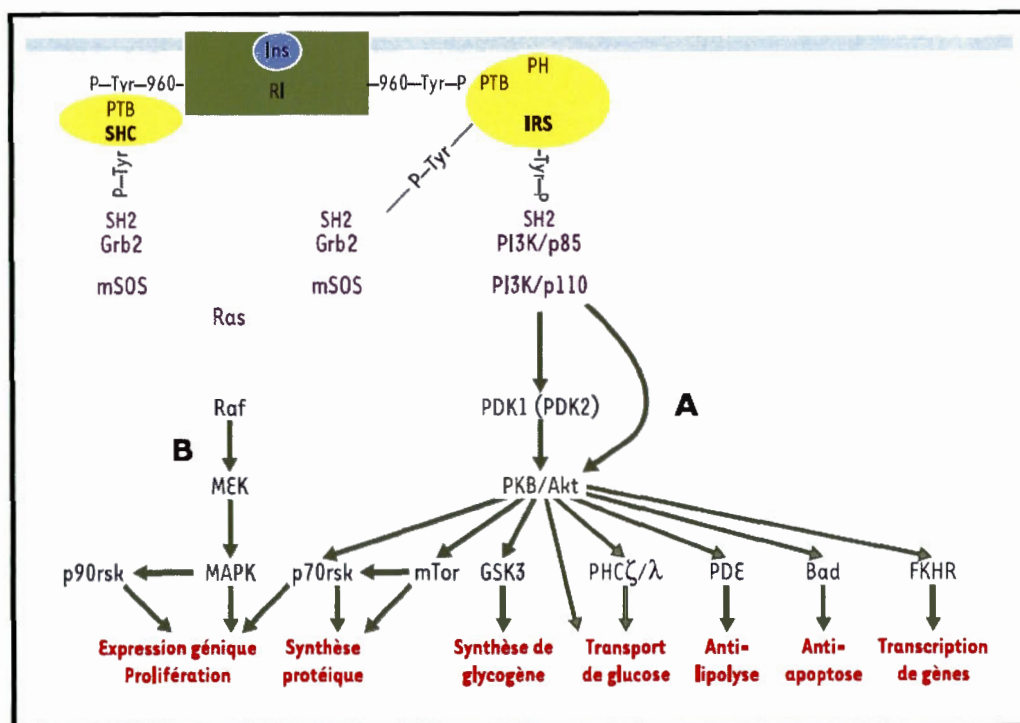


Figure 1.5 Les deux principales voies, PI3k/Akt et MAPK, activées par l'insuline. Les abréviations sont les mêmes que celles utilisées dans le texte. La figure illustre les principaux événements impliqués dans l'activation des voies PI3k/Akt (A) et MAPK (B). En rouge sont énumérées les principales réponses cellulaires induites par les deux voies en réponse à un signal insulínéique. (Tiré de Capeau, 2003).

○ Les hormones thyroïdiennes (TH) :

Sécrétées par la glande thyroïde, les hormones T3 et T4 exercent une multitude d'effets sur l'organisme, incluant des effets lipogéniques. Très tôt, de nombreuses études menées sur des hépatocytes de rats et d'embryons aviaires ont permis de mettre en évidence l'effet des TH sur la lipogenèse (Akpa et al, 2010 ; Thurmond et al, 1998). Les premiers travaux ont démontré que l'administration *in vivo* de TH à des rats pouvait augmenter de 3.5 fois la lipogenèse au niveau hépatique et que l'hormone T3 à elle seule rehaussait d'un facteur 30 l'expression de certains gènes lipogéniques dans des cultures primaires d'hépatocytes d'embryons de poulets (Akpa et al., 2010, Goodridge et al., 1998, Thurmond et al., 1998). Des études plus récentes menées au sein du laboratoire

du professeur Catherine Mounier, ainsi que d'autres études menées par d'autres équipes, ont dévoilé une partie des mécanismes impliqués. L'hormone T3 se lie à son récepteur intracellulaire TR (T3 receptor) pour stimuler la formation du complexe hétérodimérique TR-RXR qui migre vers le noyau cellulaire pour se lier, entre autres, aux séquences TRE (T3 response element) incluant celle qui est située dans la région promotrice entre -741 pb et -696 pb du gène lipogénique *FASN*. En parallèle à cette action génomique directe, l'action positive de l'hormone T3 sur la séquence TRE du gène *FASN* est aussi médiée par l'activation de la voie PI3K/Akt décrite plus haut ainsi que par la voie des MAPK mobilisant les kinases Erk1/2 et impliquant probablement un récepteur non encore caractérisé (Akpa et al, 2010 ; Thurmond et al, 1998).

La figure 6 (page suivante) illustre l'action combinée de l'insuline et de l'hormone T3 sur la régulation de l'expression des gènes lipogéniques.

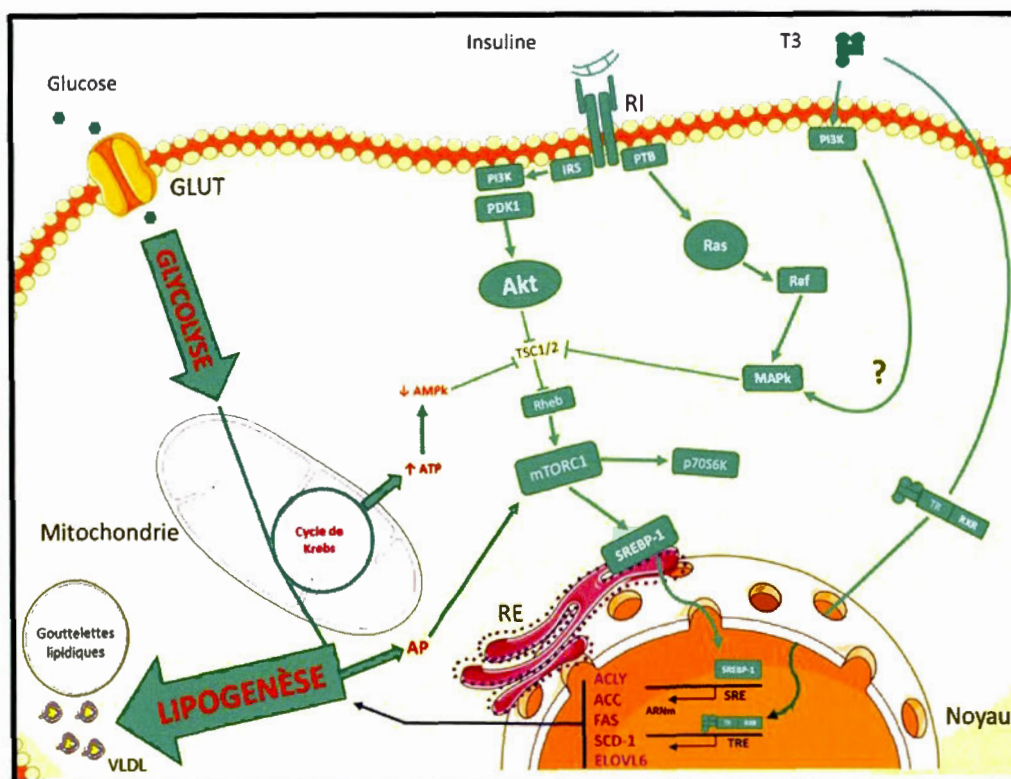


Figure 1.6 Effets combinés de l'insuline et le l'hormone T3 sur l'activation de l'expression des gènes lipogéniques. Les abréviations sont les mêmes que celles utilisées dans le texte. La figure illustre l'activation de l'expression des gènes de la lipogenèse *de novo* induite par l'action génomique directe et l'action non génomique de l'hormone T3 ainsi que la transduction du signal insulinémique. L'ATP produit au cours du cycle de Krebs est également présenté comme un inducteur indirect de la lipogenèse *de novo*.

○ La leptine :

La leptine, connue aussi sous l'appellation d'hormone de la satiété, est sécrétée essentiellement par le tissu adipeux blanc. Cette hormone joue un rôle antagoniste à l'insuline et l'hormone T3 dans l'homéostasie du métabolisme des lipides. La leptine a pour effets de décroître les réserves lipidiques du tissu adipeux blanc. Deux grands mécanismes entrent en jeu. La leptine agit sur le système nerveux central pour inhiber la manifestation des comportements associés à la prise alimentaire et elle agit aussi directement sur les cellules cibles pour y inhiber la lipogenèse au bénéfice de la β -

oxydation des lipides. Des travaux récents en métabolomique ont révélé que la leptine inhibe l'expression des SREBP-1, réduisant de fait l'expression de la plupart de leurs gènes cibles énumérés ci-haut de même que le gène PPAR γ impliqué dans la différenciation et la prolifération adipocitaire. Dernièrement, une étude menée dans notre laboratoire a permis de démontrer que, sur des hépatocytes de rats, la leptine inhibait au niveau transcriptionnel l'expression du gène SCD-1 indépendamment de l'action de l'insuline via un mécanisme impliquant la voie des MAPK (Mauvoisin and Mounier, 2011, Mauvoisin et al., 2010).

- L'hormone de croissance (GH) :

L'hormone GH est une autre hormone aux effets semblables à ceux de la leptine. Cette hormone inhibe la lipogenèse au niveau du tissu adipeux et elle favorise plutôt le développement musculaire. Bien que les mécanismes sous-jacents à un tel mode d'action demeurent mal connus, il a néanmoins été suggéré que l'action de la GH interférerait avec les éléments de la voie de signalisation de l'insuline (décrite dans la section précédente consacrée à l'insuline). De plus, l'hormone GH inhiberait par phosphorylation les facteurs Stat5 α/β qui sont aussi impliqués dans la régulation de la lipogenèse *de novo* (Teglund et al., 1998, Kersten, 2001).

- Le glucagon :

Le glucagon (l'hormone hyperglycémiante), sécrété par les cellules alpha du pancréas, est une hormone antagoniste de l'insuline. Dans des conditions d'hypoglycémie, de jeûne ou de sevrage la sécrétion de glucagon est induite. Cette hormone a pour effets d'inhiber les voies anaboliques de la lipogenèse *de novo* et de la synthèse du glycogène, tandis qu'elle favorise la dégradation du glycogène et la lipolyse (Kersten, 2001).

-La régulation nutritionnelle de la lipogenèse :

Tous les mécanismes régulateurs de la lipogenèse énumérés jusque-là sont régis à tous les niveaux par des senseurs de l'état nutritionnel de l'organisme. Les nutriments, selon leur disponibilité (apport ou privation), leur abondance et leurs types sont donc d'une certaine manière les véritables régulateurs de la lipogenèse *de novo*. Si les diètes riches en carbohydrates comme le glucose ou le fructose ou en acides gras saturés à longues chaines stimulent la lipogenèse, le jeûne et les diètes riches en acides gras polyinsaturés ou en acides gras à chaines moyennes (tous deux évoqués plus bas dans la section consacrée aux lipides bioactifs) l'inhibent. (Kersten, 2001).

○ Les glucides :

Parmi les glucides, le glucose et le fructose sont les plus puissants inducteurs de la lipogenèse. Une hausse de la glycémie stimule la lipogenèse de trois manières au moins. D'abord, une glycémie élevée favorise la sécrétion de l'insuline et des hormones thyroïdiennes tandis qu'elle inhibe la sécrétion du glucagon par le pancréas. Ensuite, le glucose et le fructose servent eux-mêmes de substrats à la voie de la lipogenèse *de novo*. Enfin, de la manière déjà expliquée précédemment, le catabolisme des glucides stimule l'activité lipogénique en grande partie via l'activation du facteur ChREBP (Kersten, 2001, Erion et al., 2013).

○ Les effets généraux des lipides bioactifs :

Les lipides bioactifs regroupent une variété d'acides gras fournis pour la plupart du temps par la diète (Aluko, 2012). Ils incluent les acides gras polyinsaturés, les acides gras monoinsaturés, les acides gras à courtes chaines, les acides gras à chaines moyennes et les acides gras conjugués (Aluko, 2012, Nagao and Yanagita, 2008). Ces

types de lipides ainsi que leurs effets sur le métabolisme sont décrits plus bas. Les lipides bioactifs exercent globalement, dans certaines conditions, des effets

inhibiteurs sur l'anabolisme des lipides et ils favorisent la dégradation des réserves lipidiques, améliorant ainsi à plusieurs égards la santé métabolique (Aluko, 2012 ; Nagao et Yanagita, 2008).

1.2 Désordre du métabolisme des lipides, obésité et conséquences :

1.2.1 L'étiologie de l'obésité :

Les diètes trop riches en carbohydrates et en acides gras saturés provoquent, via la dérégulation des mécanismes décrits plus hauts, une hausse de la lipogenèse *de novo* menant à une importante accumulation des triglycérides dans les organes de stockage comme le tissu adipeux, le foie et les muscles (Strable et Ntambi, 2010). Il peut s'en suivre une mobilisation abusive des capacités de stockage des adipocytes et de la déposition des graisses, toutes deux favorables au développement de l'obésité (Matsuzaka and Shimano, 2011, Strable and Ntambi, 2010).

La voie de la lipogenèse *de novo* est donc une composante clef du développement de l'obésité. Puisque la lipogenèse *de novo* est hautement régulée au niveau nutritionnel, les diètes riches en acides gras saturés à longues chaînes et en carbohydrates entraînent une hausse de la lipogenèse hépatique et de la synthèse des triglycérides, menant à une expansion du tissu adipeux en vue d'un stockage illimité des réserves de triglycérides. Un apport calorique excessif est donc le facteur clef du développement de l'obésité. L'alimentation et l'anabolisme des lipides sont des contributeurs du développement de l'obésité d'autant plus importants que 30% des triglycérides circulants sont synthétisés par le foie via la voie de la lipogenèse *de novo* et que 10% d'entre eux proviennent de la diète. Les 60% restants résultent pour la plupart de la réestérification des acides gras libres sécrétés par le tissu adipeux et le foie suite à l'hydrolyse (lipolyse) des réserves de triglycérides ou bien des acides gras libres provenant du processus digestif (Strable

et Ntambi, 2010 ; Matsuzaka et Shimano, 2011). Une part significative de la synthèse des lipides impliqués dans le développement de l'obésité est donc imputable au régime alimentaire.

Chez l'Homme, le surpoids ($27 < \text{IMC} < 30 \text{ kg/m}^2$), l'obésité ($30 < \text{IMC} < 45 \text{ kg/m}^2$) et l'obésité morbide ($\text{IMC} > 45 \text{ kg/m}^2$) (Haslam et James, 2005) engendrent une série de symptômes et de complications qui font de l'obésité une maladie complexe suscitant la préoccupation des professionnels de la santé et des chercheurs. Cette préoccupation est d'autant plus justifiée que le caractère pandémique de la maladie atteint des proportions alarmantes. L'obésité favorise le développement des maladies cardiovasculaires, de certains types de cancer, du syndrome métabolique et du diabète de type 2. La popularisation du terme 'diabésité' illustre d'ailleurs la relation étroite entre l'obésité et le diabète de type 2 (Haslam and James, 2005).

1.2.2 Obésité, cancers et maladies cardiovasculaires :

Le surpoids et l'obésité sont aujourd'hui clairement responsables de l'apparition de 10% des cas de cancers non associés au tabagisme. C'est plus exactement le cas pour 25% des cas de cancers gastro-intestinaux, rénaux, utérins, mammaires et des syndromes ovariens polykystiques (Haslam et James, 2005). Si l'association entre l'obésité et les cancers gastro-intestinaux est mal élucidée – bien que certaines études semblent mettre en cause le phénomène des reflux gastriques fréquents provoqués par les masses graisseuses abdominales, – l'incidence sur d'autres types de cancers pourrait être associée aux perturbations endocriniennes. Chez les femmes obèses ménopausées notamment, les taux d'œstrogène circulants sécrétés par le tissu adipeux en excès sont considérablement augmentés (Haslam et James, 2005), ce qui aurait pour effet d'augmenter la prédisposition au cancer du sein, et tout particulièrement le sous-type de cancer dit double positif aux récepteurs de l'œstrogène et de la progestérone (Chan and Norat, 2015).

En outre, l'obésité est un facteur de risque connu pour sa contribution à l'apparition des maladies cardiovasculaires (Haslam et James, 2005). Les individus souffrant de l'obésité présentent 5 fois plus de chances de développer des troubles d'hypertensions artérielles. En effet, 2 patients sur 3 à travers le monde doivent leur état d'hypertension artérielle chronique au surpoids ou à l'obésité. Il a été démontré que l'hypertension artérielle induite par l'obésité est la conséquence directe de l'expansion de la masse adipocytaire de laquelle résultent une hausse du volume sanguin total et une sécrétion chronique accrue des angiotensinogènes et des profibrinogènes connus pour leurs effets hypertensifs. Par ailleurs, l'obésité augmente considérablement les risques d'athérosclérose et d'épisodes ischémiques augmentant d'autant plus le risque de MCV (Haslam et James, 2005).

1.2.3 L'obésité et la syndrome métabolique :

L'affection métabolique la plus communément répandue chez les patients obèses est la NAFLD (non alcoholic fatty liver disease). Avec une prévalence que les estimations situent entre 30% et 46% dans les pays industrialisés, la NAFLD résulte en une forte accumulation ectopique de graisse dans le foie. Le dépôt ectopique de graisse se définit alors comme "le stockage excessif des triglycérides au sein de cellules non adipocytaires (par exemple les hépatocytes) qui n'en contiennent en temps normal qu'en de faibles quantités" (Lettner et Roden, 2008). Un tel mode de stockage qui survient en général lors d'un débordement du tissu adipeux se traduit par l'induction de la lipotoxicité hépatique dont les conséquences physiologiques sont à l'origine des symptômes de la NAFLD (Matsuda et al, 2013 ; Lettner et Roden, 2008).

La NAFLD affecte 70% des patients obèses et elle peut évoluer dans 20% des cas en fibrose hépatique, puis en cirrhose non alcoolique voire même en hépatocarcinome. Le développement de la NAFLD est en plus indissociable de l'apparition du diabète de type 2, d'où le lien étroit entre l'obésité et le diabète illustré plus haut par la contraction

“diabésité”. Le syndrome métabolique se manifeste toutefois à travers plusieurs autres symptômes inter-reliés (Matsuda et al., 2013, Matsuzaka and Shimano, 2011, Zhang et al., 2014, Miyazaki et al., 2007).

L'obésité, la NAFLD et toute forme de stockage ectopique de lipides sont associées à un état inflammatoire systémique chronique de bas grade. Au niveau hépatique, le stockage lipidique ectopique induit un stress du réticulum endoplasmique associé à l'activation du facteur proinflammatoire NF- κ B qui active à son tour l'expression et la sécrétion des molécules médiatrices de l'inflammation. Parmi celles-ci, l'on peut nommer des cytokines comme l'interleukine-1 β et le TNF α et des chimiokines comme MCP1 (Zhang et al, 2014 ; Nagao et Yanagita, 2008). Ces facteurs sont également sécrétés par le tissu adipeux en expansion (Matsuda et al, 2013 ; Matsuzaka et Shimano, 2011 ; Zhang et al, 2014 ; Nagao et Yanagita, 2008). En plus d'induire un stress oxydatif au niveau des hépatocytes qui se caractérise par une accumulation délétère de ROS favorisant l'apoptose, les médiateurs de l'inflammation cités plus haut, ainsi que les acides gras libres eux-mêmes, entraînent une résistance à l'insuline et, par extension, un diabète de type 2 qui se développe chez un grand nombre de patients obèses. Les médiateurs de l'inflammation et les acides gras libres alors en abondance dans les hépatocytes activent la protéine kinase JNK1 qui, en phosphorylant l'IRS1 sur son résidu Ser312, inhibe son interaction avec le récepteur à l'insuline (RI), ce qui bloque la voie de signalisation de réponse à l'insuline décrite plus haut provoquant ainsi l'insulinorésistance (Matsuda et al, 2013 ; Matsuzaka et Shimano, 2011 ; Zhang et al, 2014). Il a par ailleurs été démontré que les acides gras libres induisaient l'inflammation et la résistance à l'insuline via la phosphorylation de la protéine kinase I κ B, levant ainsi l'inhibition du facteur NF- κ B exercée par I κ B. Le facteur NF- κ B peut alors activer le processus inflammatoire et la résistance à l'insuline pendant que la protéine I κ B phosphorylée accentue la résistance à l'insuline par une phosphorylation directe de l'IRS1 sur son résidu Ser312 (Matsuda et al, 2013 ; Matsuzaka et Shimano, 2011 ; Zhang et al, 2014). De plus, le facteur NF- κ B activé semble accentuer autrement la résistance à l'insuline induite par la lipotoxicité, selon un mécanisme encore mal exploré,

impliquant l'activation du Toll-like Receptor-4 (TLR-4). Cela a été mis en évidence notamment chez des souris soumises à une diète induisant l'obésité (Kim et al., 2007, Shah, 2007). L'éventuel rôle du facteur NF- κ B comme un activateur direct de la résistance à l'insuline n'a pour l'heure pas été observée.

Au niveau systémique, la résistance à l'insuline chez les patients obèses est aggravée par l'altération de l'activité endocrine du tissu adipeux. En effet, les interleukines 1/6 et le TNF α inhibent la sécrétion d'adiponectines par le tissu adipeux. De plus, l'expansion du tissu adipeux a aussi pour effet de diminuer la sécrétion des adiponectines. (Nagao et Yanagita, 2008 ; Haslam et James, 2005). Or les adiponectines exercent des effets protecteurs contrant la résistance à l'insuline. Un tel désbalancement endocrinien dû à l'inflammation systémique chronique vient donc aggraver l'état général de résistance à l'insuline. (Nagao et Yanagita, 2008 ; Haslam et James, 2005).

En résumé, ces connaissances expliquent bien pourquoi l'obésité qui résulte d'un déséquilibre du métabolisme des lipides est considérée comme une véritable maladie. Ses effets délétères sur la santé de l'organisme se traduisent par le développement du stress oxydatif au niveau hépatique, du stress du réticulum endoplasmique, de l'inflammation systémique chronique, de la résistance à l'insuline, du syndrome métabolique, et de la prédisposition à des maladies chroniques plus ou moins graves comme le diabète de type 2, les troubles cardiovasculaires et certains cancers.

1.3 La lutte contre l'obésité par l'alimentation :

L'obésité, de par son incidence alarmante et ses divers effets secondaires délétères décrits précédemment, est à juste titre considérée comme une véritable maladie humaine, dont la prévention et le traitement suscitent un intérêt croissant dans la communauté scientifique. L'une des stratégies que nous et d'autres chercheurs proposons consiste à remédier à l'obésité par la modulation négative de la voie de la lipogenèse *de novo* en contrôlant l'un de ses trois niveaux de régulation (nutritionnel,

hormonal ou génique) (Strable et Ntambi, 2010). Bien qu'il soit possible de cibler avec précision l'expression des gènes lipogéniques ou d'hormones impliquées dans le mécanisme de satiété au moyen d'agents pharmacologiques (Mastorakos et al., 2000), ces approches se heurtent à l'impossibilité actuelle de cibler spécifiquement des organes métaboliques comme le foie. Les limites des approches pharmacologiques visant les trois niveaux de régulation de la lipogenèse sont donc dues à l'ubiquité de cette voie anabolique et à son implication essentielle dans des fonctions cellulaires et physiologiques autres que le stockage de graisse (voir la section I)1 de l'introduction : "Les fonctions biologiques de la lipogenèse *de novo*").

Étant donné le manque de spécificité des stratégies ciblant la régulation hormonale et génique de la lipogenèse, il paraît plus sécuritaire de favoriser une approche nutritionnelle pour prévenir le développement de l'obésité et pour en réduire les symptômes.

1.3.1 Les lipides bioactifs :

Les lipides bioactifs, ou les lipides biologiquement actifs, sont issus principalement de la diète et ils exercent des effets métaboliquement bénéfiques soit via le remodelage de la composition lipidique des tissus soit via la modulation des voies de signalisations impliquant les facteurs de transcription SREBPs, LXR α , RXR, HNF4 α et NF κ B (Aluko, 2012 ; Nagao et Yanagita, 2008). Les lipides bioactifs sont donc cités dans de nombreuses études pour leurs capacités à limiter l'anabolisme des lipides, à restaurer la sensibilité à l'insuline, et à prévenir le syndrome métabolique. Ces composés regroupent les acides gras monoinsaturés (MUFA), les acides gras polyinsaturés (PUFA ; les n-3PUFA et les n-6PUFA), les acides gras à courtes chaînes (SCFA) et les acides gras à chaînes moyennes (MCFA). Ces types de lipides sont souvent présentés comme de potentiels agents de prévention et de lutte dans le domaine de la nutraceutique consacrée

au traitement de l'obésité et des maladies métaboliques associées (Aluko, 2012 ; Nagao et Yanagita, 2008).

1.3.1.1 Les acides gras monoinsaturés (MUFA) :

Les MUFA, incluant l'oléate (en abondance dans l'huile d'olive vierge), exercent des effets bénéfiques sur le métabolisme (Aluko, 2012). Il a été démontré que la prise d'aliments riches en MUFA entraînait, chez des singes en conditions expérimentales, une diminution de 17% de la cholestérolémie, et une diminution de 28% de la concentration en ApoB circulants (Aluko, 2012). Les ApoB, figurant parmi les principaux constituants des VLDL, sont des indicateurs directs de la triglycéridémie. En outre, l'oléate semble également retarder la progression de certaines formes de démences. (Park et al., 2006). Cet effet neuroprotecteur suscite l'intérêt des chercheurs depuis qu'une étude a révélé que des prises de concentrations croissantes d'oléate et d'autres PUFAs, variant entre 25 μ M et 250 μ M, inhibaient de manière dose-dépendante l'activité au niveau cérébral du PEP (Prolyl endopeptidase), une enzyme dont l'activité est associée à l'apparition et à la progression de la maladie d'Alzheimer (Park et al., 2006 ; Aluko, 2012). De plus, l'huile d'olive et ses constituants incluant l'oléate sont cités dans de nombreuses études comme ayant des vertus anti-cancéreuses. Enfin, une étude publiée en 2007 par Hussein *et al* a révélé qu'une diète enrichie en huile d'olive ou en oléate réduisait de 30% le contenu hépatique en triglycérides chez des rats adultes de la lignée Sprague Dawley atteints de NAFLD induite expérimentalement par la diète.

1.3.1.2 Les acides gras polyinsaturés (PUFA) :

Les PUFAs sont de loin les lipides les plus largement étudiés dans le domaine de la nutraceutique. Ces lipides se distinguent par l'insertion de 2 à 6 doubles liaisons

covalentes au sein de leurs chaînes carbonées. Les PUFA incluent les n-3PUFAS, plus connus sous l'appellation d'oméga-3, et les n-6PUFAS qui sont les oméga-6 (Aluko, 2012 ; Nagao et Yanagita, 2008). Le premier carbone ω -1 (oméga-1) est le carbone le plus éloignée du carbone Δ -1 associé à la fonction acide carboxylique. La nomenclature des n-3PUFAS et des n-6PUFAS dépend donc du nombre d'atomes de carbone séparant le carbone ω -1 du premier atome de carbone qui établit une double liaison covalente avec son atome de carbone adjacent. (Aluko, 2012 ; Nagao et Yanagita, 2008).

Les principales sources alimentaires de PUFAs sont les poissons gras, les arachides, les céréales et les produits dérivés du soja. Les principaux oméga-3 sont l'acide linoléique (LA), l'acide docosapentanoïque (DPA), l'acide eicosapentanoïque (EPA) et l'acide docosahexanoïque (DHA). Quant aux oméga-6, ils se retrouvent en abondance sous leur forme la plus simple, l'acide linoléique (Aluko, 2012 ; Nagao et Yanagita, 2008).

Les PUFAs présentent de multiples vertus qui en font de potentiels agents de lutte et de prévention contre la NAFLD et le syndrome métabolique associé à l'obésité. Les PUFAs sont bien documentés pour leur potentiel anti-obésité (Xu et al, 1999 ; Aluko, 2012 ; Nagao et Yanagita, 2008). Au niveau des hépatocytes, les PUFAs, inhibent l'expression des gènes lipogéniques clefs que sont la *FASN* et l'*ACACA*, via l'inhibition de l'expression et de l'activité du facteur SREBP-1, d'une manière dose-dépendante (Xu et al., 1999). Depuis 1999, une pléthore d'études a permis de confirmer l'effet métaboliquement bénéfique des PUFAs, et plus particulièrement celui des oméga-3. Il a d'abord été démontré qu'une prise journalière prolongée de 3 à 4 grammes par jour d'oméga-3 chez les humains réduisait significativement la triglycéridémie comme le révélait alors la chute significative du ratio VLDL/HDL circulants. (Ebbesson et al, 2005 ; Nagao et Yanagita, 2008 ; Aluko, 2012). Ces études métapopulationnelles ont également permis de révéler les propriétés antihypertensives des oméga-3 (Ebbesson et al., 2005). Ces derniers ont par ailleurs été caractérisés au terme d'études menées aussi bien sur des modèles animaux dont l'obésité fut induite par la diète que sur des patients obèses, pour leurs capacités à réduire la déposition des graisses dans le tissu adipeux. (Ebbesson et al, 2005 ; Nagao et Yanagita, 2008 ; Aluko, 2012). En outre, d'autres

études populationnelles menées notamment auprès des populations Eskimos de l'Alaska ont révélé qu'un apport régulier en oméga-3 via la consommation traditionnelle de poissons gras limitait la prévalence du syndrome métabolique et du diabète de type 2, en améliorant la sensibilité à l'insuline et la tolérance au glucose (Ebbesson et al, 2005 ; Nagao et Yanagita, 2008 ; Aluko, 2012). La sensibilité à l'insuline est dans ces conditions inversement corrélée à la triglycémie et à la pression artérielle. De plus, il a été démontré que les PUFAs dérivés de la consommation de poissons favoriseraient la sécrétion d'adiponectines (Ebbesson et al, 2005 ; Nagao et Yanagita, 2008). Les adiponectines sont des adipocytokines essentiellement par le tissu adipeux. Les adiponectines, comme l'ACRP30, sont connues pour améliorer la sensibilité à l'insuline et pour limiter les symptômes associés à l'obésité et à la NAFLD (Gatselis et al., 2014, Fukushima et al., 2009, Berg et al., 2002) .

Quant aux propriétés anti-inflammatoires des oméga-3, plus exactement celles du DHA et de l'EPA, elles ont été mises en évidence par plusieurs études menées sur des cultures de lignées cellulaires. Les oméga-3 atténuent le stress oxydatif en activant le glutathion, un puissant antioxydant qui va alors détoxifier et éliminer les ROS, inhibant ainsi l'activation du facteur NFκB induite par les ROS et donc l'expression des gènes proinflammatoires susmentionnés. (Aluko, 2012 ; Nagao et Yanagita, 2008). L'effet anti-inflammatoire des oméga-3 est accentué en parallèle par le phénomène naturel de la conversion de l'EPA et du DHA par l'organisme en résolvines et en protectines (Aluko, 2012 ; Nagao et Yanagita, 2008). Les résolvines et les protectines sont des molécules qui dérivent de la transformation par l'organisme des EPA et DHA. Ces deux types de molécules sont documentés comme exerçant des effets neuroprotecteurs et anti-inflammatoires via l'inhibition du facteur NFκB (Aluko, 2012 ; Nagao et Yanagita, 2008).

L'usage des PUFA au regard de leurs innombrables propriétés bénéfiques pour la santé métabolique, pour la prévention et la lutte contre l'obésité, bien que généralisé, se heurte toutefois à plusieurs écueils. Il s'agit de problèmes liés à la digestibilité variable et aléatoire d'un individu à l'autre des PUFA, aux possibles risques proinflammatoires

et procarcinogènes induits par de hauts ratios en oméga-6/oméga-3 et à la raréfaction des ressources halieutiques qui constituent la principale source en PUFA (Aluko, 2012, Rogalski and Carrer, 2011, Tou et al., 2011). L'utilisation de ces lipides bioactifs pour la prévention et la lutte contre l'obésité demeure certes une piste privilégiée, mais il est certainement préférable d'exploiter ceux qui offrent les meilleurs bénéfices à la santé métabolique humaine pour de moindres coûts et effets secondaires.

1.3.2 Les acides gras à chaînes moyennes (MCFA), des lipides bioactifs prometteurs :

1.3.2.1 Les propriétés générales des MCFA :

Dans le cadre de la lutte contre l'obésité par la diète, il est de plus en plus recommandé de réduire la consommation des LCFA au profit d'une diète plus riche en MCFA. En effet, plusieurs études ont déjà suggéré que les triglycérides à chaînes moyennes (MCT) semblent être de bons agents de prévention contre l'obésité contrairement aux LCT (*Long Chain Triglycérides*) qui la favorisent par les mécanismes déjà décrits (St-Onge and Jones, 2002). Les MCT sont des triglycérides issus de l'estérification d'acides gras saturés longs de 6 à 12 atomes de carbone correspondant, dans l'ordre croissant, à l'hexanoate (C6 :0), l'octanoate (C8 :0), le décanoate (C10 :0) et le dodécanoate (C12 :0) (Marten et al, 2006 ; Nagao et Yanagita, 2008). Les MCFA ont comme principales sources naturelles la noix de coco, l'huile de palme et les graines de ginkgo biloba où ils peuvent constituer plus de la moitié de la quantité totale de lipides. Les MCFA peuvent aussi constituer jusqu'à 12% de la masse lipidique du lait produit par certains pedigree de vaches (Marten et al, 2006 ; Nagao et Yanagita, 2008 ; Akpa et al, 2010). Quant aux suppléments alimentaires artificiels à base de MCT, comme l'Axona®, ils sont beaucoup plus concentrés en octanoate ou en dodécanoate. Dans beaucoup d'huiles artificielles à base de MCT, l'octanoate et le dodécanoate sont ajoutés à des quantités relatives équimolaires (50:50) (Sharma et al., 2014, Marten et al., 2006).

1.3.2.2 Les propriétés métaboliquement bénéfiques des MCFA :

Les MCT sont considérés depuis longtemps comme des agents bénéfiques pour la santé métabolique. (Marten et al, 2006 ; Akpa et al, 2010 ; Gracey et al, 1970 ; Nagao et Yanagita, 2008). Reconnue officiellement pour son innocuité depuis 1994, la consommation des MCT est recommandée depuis les années 1950 pour les traitements diététiques pédiatriques ciblant les problèmes de malabsorption lipidique, d'insuffisance pancréatique, de syndrome métabolique, d'inflammations chroniques ou encore d'hyperchylomicronémie familiale (Gracey et al., 1970). Des formules enrichies en MCT sont même prescrites aux nouveau-nés prématurés. (Marten et al, 2006 ; Akpa et al, 2010 ; Gracey et al, 1970 ; Nagao et Yanagita, 2008).

Plusieurs études antérieures ont mis en évidence les effets bénéfiques des MCFA sur différents niveaux du métabolisme. En effet, leurs propriétés biochimiques en font des agents potentiels de prévention contre l'obésité et de tous ses effets secondaires comme l'insulinorésistance, l'inflammation systémique chronique, le stress hépatique et le dépôt de graisses adipocitaire et ectopique (Marten et al, 2006 ; St-Onge et Jones, 2002). D'abord, les MCT diffèrent des LCT (chaines longues de plus de 12 atomes de carbone) par leur plus grande vitesse d'absorption intestinale et leur transport plus efficace vers la veine porte, avec une mobilisation quasi nulle dans les chylomicrons (Papamandjaris et al., 1998, Papamandjaris et al., 2000). Au niveau des hépatocytes, les MCFA subissent une β -oxydation plus rapide et plus efficace car, à l'inverse des LCFA, ils peuvent traverser la membrane mitochondriale externe par diffusion simple sans l'intervention de la navette protéique CPT1 (*Carnitine palmitoyl transferase*). Ils seront par la suite activés par l'enzyme MCACS (*Medium chain Acyl-CoA synthase*) en vue de leur oxydation rapide (Papamandjaris et al., 1998, Papamandjaris et al., 2000). Au final, une faible proportion des MCFA consommés sont estérifiés sous forme de MCT dans le foie (Papamandjaris et al, 1998 ; Marten et al, 2006 ; Nagao et Yanagita, 2008). De par leur forte propension à subir la β -oxydation, les MCFA sont moins convertis en

triglycérides que les LCFA et ils sont donc moins favorables au stockage des graisses dans le tissu adipeux et dans les autres organes de réserve.

Dans la continuité de ces observations, il a été prouvé que la consommation des MCT favorise la dépense d'énergie et la thermogénèse (énergie calorique) et qu'elle tend à limiter la déposition des acides gras (St-Onge et Jones, 2002 ; Nagao et Yanagita, 2008). En effet, des expériences menées sur deux groupes de sujets humains, minces et obèses, ont montré que les sujets obèses ont eu une dépense d'énergie de 48% à 65% plus grande après la consommation d'une diète enrichie en MCT, en comparaison avec d'une diète enrichie uniquement en LCT. Deux semaines après, il a été constaté une baisse de poids significative et une thermogénèse postprandiale plus importante chez des individus d'un IMC supérieur ou égal à 23kg/m^2 , suite à la consommation de 10g/jour de MCT, en comparaison avec un groupe nourri avec une diète isocalorique de LCT (St-Onge et Jones, 2002 ; Nagao et Yanagita, 2008).

Aujourd'hui, il paraît évident que « la perte de poids, la faible lipémie et la diminution du stockage des graisses induites par les MCT sont les résultats directs de la forte propension des MCFA à la β -oxydation hépatique qui se traduit naturellement par une hausse de la dépense d'énergie et de la thermogénèse » (Marten et al, 2006).

En outre, les MCFA sont décrits pour leur action bénéfique sur le métabolisme du glucose dans le sens où ils semblent améliorer la sensibilité à l'insuline y compris dans des conditions d'hyperlipémies induites par la diète. Par exemple, une expérience a montré que des rats de laboratoires nourris durant 4 semaines avec une diète enrichie en MCT présentaient, dans les conditions postprandiales, une glycémie et une triglycéridémie plus basses ainsi qu'une sensibilité à l'insuline de 30% plus élevée que celles mesurées sur des rats nourris avec une diète isocalorique riche en LCT (Wein et al., 2009). Sur la base de ces observations, les auteurs proposent l'hypothèse selon laquelle les MCT, à l'inverse des LCT, sont associés, dans les conditions postprandiales, à une moindre concentration sérique en acides gras libres. Cela viendrait du fait qu'ils possèdent une plus grande capacité à être catabolisés, diminuant ainsi les risques d'insulinorésistance, un phénomène secondaire à une lipémie trop élevée et à une

accumulation excessive des graisses chez les sujets obèses (Frayn, 2005, Marten et al., 2006).

Il est ensuite intéressant d'évoquer les vertus anti-inflammatoires prêtées aux MCT. Il a été suggéré que l'octanoate (sous ses deux formes libre et estérifiée) inhiberait la sécrétion des cytokines (comme l'interleukine 8) chez les sujets ayant développé une inflammation, si bien qu'il est parfois prescrit pour aider à soulager les patients souffrant de la maladie de Crohn (Marten et al, 2006). De plus, des doses élevées de MCT s'avèrent efficaces pour diminuer aussi bien les symptômes associés aux stéatoses hépatiques alcoolique et non alcoolique que ceux associés au stress oxydatif lié à l'accumulation excessive de triglycérides dans le foie. Cela a été vérifié chez les animaux de laboratoire puis chez les humains (Marten et al, 2006). Dernièrement, il a même été suggéré que les MCFA pouvaient améliorer les fonctions mitochondriales dans des conditions d'inflammations sévères (Hecker et al., 2013). En effet, Hecker et ses collaborateurs ont démontré qu'à des concentrations de l'ordre de 30µM, l'hexanoate, l'octanoate et l'acide heptanoïque peuvent améliorer le rendement de la respiration mitochondriale des cellules endothéliales et monocytaires humaines cultivées dans des conditions proinflammatoires en présence de TNFα, sans augmenter significativement la sécrétion des cytokines proinflammatoires. Toutes ces observations suggèrent que les MCFA, en plus de leurs effets anti-inflammatoires directs, peuvent limiter les effets cytotoxiques d'une inflammation chronique systémique induite par exemple par un choc septique, un syndrome métabolique ou encore une NAFLD. (Hecker et al, 2013).

Il est d'usage, dans un contexte actuel où un large pan de la recherche scientifique est consacré aux maladies neurodégénératives, d'évaluer l'impact, sur la progression de ces maladies, de tout agent dont les propriétés anti-inflammatoires sont prouvées. Il devient donc fort intéressant d'indiquer ici que de très récentes expérimentations ont permis d'avancer que les MCT, à l'instar des oméga-3 cités plus haut, pourraient limiter la progression de la maladie d'Alzheimer (Sharma et al, 2014). Plus exactement, une

observation clinique a révélé qu'une consommation quotidienne de MCT via l'Axona® améliorait les performances cognitives des patients atteints de la maladie d'Alzheimer à des stades de progression légers et modérés (Sharma et al, 2014). Les corps cétoniques dérivés du catabolisme des MCT représenteraient, pour les neurones de ces patients, des formes d'énergies alternatives au glucose ; le métabolisme de ce dernier étant fortement ralenti dans les cellules malades (Sharma et al., 2014).

Par ailleurs, les thérapies à base de MCT semblent améliorer la santé cardiaque de rats de la souche SHR (Spontaneously hypertensive Rats) atteints d'hypertension artérielle chronique (Iemitsu et al., 2008). Les rats de cette souche présentent spécifiquement au niveau cardiaque une mutation du gène *FAT/CD36* codant pour une enzyme membranaire nécessaire au transport des LCFA. Cette mutation entraîne une cardiomyopathie induisant l'état hypertensif (Iemitsu et al, 2008). L'administration durant 16 semaines de MCT à base d'octanoate et de décanoate à ces animaux, a favorisé la fonction et l'hypertrophie cardiaques, inhibé significativement l'activation de la protéine kinase JNK au niveau cardiaque, et amélioré l'activité des enzymes du catabolisme des lipides, le tout sans effet significatif sur la pression sanguine. Ces observations suggèrent donc de bons effets sur la santé cardiovasculaire de la part des MCFA.

Enfin, d'autres études menées notamment au sein du laboratoire du Dr. Catherine Mounier ont permis de suggérer que les MCFA pouvaient moduler négativement la voie de la lipogenèse *de novo* en diminuant directement l'expression de certains gènes lipogéniques. En effet, l'hexanoate et l'octanoate sont capables d'inhiber l'expression de l'*EM* (enzyme malique) au niveau transcriptionnel et l'expression du gène *FASN* à la fois aux niveaux transcriptionnel et traductionnel (Roncero et Goodridge, 1992 ; Thurmond et al, 1998), ainsi que l'activité de l'enzyme FAS, et ce particulièrement en présence d'insuline et de T3 (Akpa et al, 2010). Toutefois, l'hexanoate, en divisant d'un facteur 3 l'activité de l'enzyme FAS en présence d'insuline et d'hormone T3 dans des hépatocytes d'embryons de poulets, s'est avérée être un plus fort inhibiteur de la

lipogénèse que l'octanoate qui divisait l'activité de FAS d'un facteur 2 dans les mêmes conditions (Akpa et al, 2010). Pour cette raison, l'étude présentée dans ce mémoire sera axée exclusivement sur l'hexanoate. Selon les données préalablement recueillies, les MCFA interféreraient avec les actions génomiques et non génomiques de la T3, le récepteur de la T3 activé, ainsi qu'avec les facteurs de transcription activés par la voie de l'insuline. (Roncero et Goodridge, 1992 ; Thurmond et al, 1998 ; Akpa et al, 2010 ; Radenne et al, 2008). Outre cette hypothèse, les véritables mécanismes d'actions moléculaires sous-jacents à de tels effets antilipogéniques de la part des MCFA demeurent largement inconnus.

1.4 Hypothèses et objectifs spécifiques du travail :

1.4.1 Hypothèses de travail :

Compte tenu de l'ensemble des vertus attribuées aux MCFA, l'objectif spécifique du travail de maîtrise présenté dans le présent mémoire est d'étudier l'impact de l'hexanoate, un acide gras à chaîne moyenne, sur l'anabolisme des lipides et la sensibilité à l'insuline des hépatocytes. L'étude se propose de s'inscrire dans la continuité des travaux consacrés, jusque-là, à l'élucidation des propriétés bénéfiques des MCFA pour la santé métabolique. Dans un cadre plus global, il est proposé d'en apprendre davantage sur le potentiel des MCFA comme agents nutraceutiques naturels pour la prévention et la lutte contre l'obésité et les désordres métaboliques associés. Ce travail s'articule autour de deux hypothèses de départ clefs. La première est que l'hexanoate pourrait agir comme un inhibiteur du rendement de la lipogénèse *de novo* induite par l'insuline et l'hormone T3. La seconde hypothèse qui en découle propose que l'hexanoate puisse abolir la résistance à l'insuline des hépatocytes induite par la lipotoxicité.

1.4.2 Objectifs de l'étude :

1.4.2.1 Premier objectif d'étude :

Le premier objectif de l'étude consistera à vérifier si l'hexanoate, à des concentrations équivalentes à celles retrouvées dans la littérature, est capable d'inhiber l'expression des enzymes lipogéniques et la synthèse des acides gras par la voie de la lipogenèse *de novo* induites par l'insuline et la T3, sur des hépatocytes de la lignée HepG2 et des cultures primaires d'hépatocytes de rats. Plus exactement, les hépatocytes seront exposés ou non aux hormones prolipogéniques (l'insuline et la T3) en présence ou en absence de C6. Au terme de cette incubation, seront évalués les niveaux de transcription des gènes lipogéniques clefs ainsi que les contenus cellulaires en triglycérides synthétisés *de novo*. Une baisse du niveau de transcription des gènes lipogéniques en corrélation avec une baisse de la synthèse *de novo* des triglycérides, tous deux activés en principe activés de manière synergique par les hormones, sont attendues en présence de C6.

1.4.2.2 Second objectif d'étude :

Si l'administration de C6 aux cellules HepG2 et aux hépatocytes de rats mis en cultures parvient à limiter l'accumulation des triglycérides cellulaires, le second objectif consistera donc à vérifier si le C6 peut y abroger la résistance à l'insuline induite par la lipotoxicité. Pour cela, une insulino-résistance sera induite expérimentalement aux deux types cellulaires, en présence ou en absence de C6. Leur sensibilité à l'insuline sera alors évaluée en fonction du niveau d'activation de la voie PI3k/Akt/mTOR ainsi qu'en fonction du taux de synthèse de glycogène, suite à une stimulation à l'insuline. En présence de C6, il est attendu d'assister à une hausse des niveaux de phosphorylation des éléments de la voie de signalisation de l'insuline suivie d'une hausse des taux de

synthèse de glycogène, lors d'une stimulation à l'insuline, y compris en conditions lipotoxiques.

CHAPITRE III

MÉTHODOLOGIE

2.1 Produits et réactifs :

L'enzyme collagénase-H a été commandée auprès de la compagnie Gibco® (Life technologies, USA), de même que les solutions d'antibiotiques "Pénicilline : Streptomycine" (PS) et d'antibiotiques associés aux antifongiques "Pénicilline : Streptomycine : amphotéricine B" (PSA). Les milieux de cultures EMEM (Eagle's minimum essential medium) et DMEM/F12 (Dulbecco's modified essential medium) ont tous deux été fournis par la compagnie Wisent (Quebec, Canada). Quant au sérum foetal bovin (FBS) utilisé, il a été manufacturé par la compagnie Hyclone (ThermoFisher scientific) de même que le collagène purifié.

Mis à part l'insuline recombinante humaine lyophilisée commandée auprès de la compagnie Wisent (Quebec, Canada), le sodium-hexanoate (C6), la 3,3',5-Triiodo-L-thyronine (hormone T3) et le [^{14}C]-acétate ont été fournis par Sigma Aldrich (Oakville, Canada).

Pour la réalisation des Western blot, c'est la compagnie Cell Signaling Technology (Danvers, USA) qui a fourni les anticorps primaires monoclonaux de lapins spécifiques aux protéines bêta-actine, phospho-Akt (Ser473), phospho-Akt (Thr308), Akt total, phospho-p70s6k, p70s6k total, ainsi que les anticorps secondaires monoclonaux de chèvre "Hoarsradish peroxidase-conjugated" spécifiques aux IgG de lapins.

Pour la réalisation des RT-PCR semi quantitatives, le réactif Trizol, les kits de rétrotranscription Superscript II et de PCR "Taq. Pol. Enz.", ainsi que les couples d'amorces spécifiques aux ADNc des transcrits humains et murins *FASN*, *ACACA* et *HPRT* ont été obtenus auprès de la compagnie Invitrogen (Life technologies).

Les séquences d'amorces complémentaires aux gènes humains sont les suivantes :

FASn :

Sens : 5' -AAGGACCTGTCTAGGTTTGATGC- 3'

Antisens : 5' -TGGCTTCATAGGTGACTTCCA- 3'

ACACA :

Sens : 5' -TCACACCTGAAGACCTTAAAGCC-3'

Antisens : 5' -AGCCCACACTGCTTGTACTG-3'

HPRT :

Sens : 5' -CCTGGCGTCGTGATTAGTGAT-3'

Antisens : 5' -AGACGTTCAAGTCCTGTCCATAA-3'

Les séquences complémentaires aux gènes de rats sont les suivantes :

Fasn :

Sens : 5' -TCGAGACAATCGTTTGAGC-3'

Antisens : 5' -TCAAAAAGTGCATCCAGCAG -3'

HPRT :

Sens : 5' - CTCATGGACTGATTATGGACAGGAC -3'

Antisens : 5' - GCAGGTCAGCAAAGAACTTATAGCC -3').

Pour finir, le kit fluorimétrique de dosage de la synthèse du glycogène cellulaire et le kit de dosage des acides phosphatidiques totaux ont été fournis par la compagnie Cayman Chemical (Michigan, USA).

2.2 Extraction des cellules hépatiques de rats :

Les hépatocytes primaires ont été extraits à partir de foies de rats adultes de la souche Sprague Dawley (Charles River, Montréal, Canada) pesant environ 250 g. L'extraction d'une population d'hépatocytes purifiée à 98% avec un taux de viabilité supérieur à 95% a été réalisée suivant un protocole classique de perfusion de collagénase-H suivi d'une centrifugation différentielle en milieu dense (Harbrecht et al., 1996). Les protocoles

impliquant l'expérimentation sur les animaux ont été validés par le conseil institutionnel de protection des animaux (CIPA) de l'UQAM.

2.3 Cultures cellulaires :

Le choix des modèles cellulaires pour la réalisation de cette étude a porté sur les hépatocytes primaires de rats et les cellules de la lignée HepG2, un hépatocarcinome humain, deux outils réputés fiables pour l'étude du métabolisme des lipides. Le choix de ces deux modèles cellulaires a aussi été motivé par leur capacité à répondre à l'insuline, comme établi par nos études antérieures ainsi que celles d'autres équipes (Xia et al., 2015, Xia et al., 2007, Akpa et al., 2010).

Les hépatocytes extraits de foies de rats ont été dilués dans du milieu de culture DMEM/F12 enrichi avec 10% de FBS et 1.5% de PSA. Les suspensions d'hépatocytes ont ensuite étéensemencées dans des plaques de cultures de 12 puits préalablement revêtues d'une mince couche de collagène ($5\mu\text{g}/\text{cm}^2$), à raison de 500 000 cellules par plaque. Les cultures primaires d'hépatocytes de rats ont alors été mises en incubation à 37 degrés Celsius, dans une atmosphère humide avec 5% de CO_2 . Au bout de 24h, les cellules ont été sevrées par le remplacement de leur milieu de culture avec du milieu frais dépourvu de FBS.

Les cellules de la lignée HepG2, prises entre un minimum de 4 et un maximum de 20 passages ont, elles, étéensemencées dans des plaques de cultures de 12 puits à raison de 200 000 cellules par plaque dans du milieu de culture EMEM enrichi à 10% de FBS et à 1% de PS. Les cellules ont ensuite été mises en incubation à 37 degrés Celsius, dans une atmosphère humide avec 5% de CO_2 . Une fois confluentes à 70-80%, les cultures de cellules HepG2 ont été sevrées 24h par exposition à du milieu dépourvu de FBS, pour la plupart des expériences (excluant l'expérience de dosage des acides phosphatidiques cellulaires totaux).

2.4 Analyse de l'effet du C6 sur la synthèse *de novo* des triglycérides :

Après un sevrage d'une durée minimale de 24h les cultures primaires d'hépatocytes de rats ont été réparties en huit conditions différentes dans un milieu de culture de base DMEM/F12 (10% de FBS et 1.5% de PSA) : 1) Condition basale sans stimulation, 2) En présence de d'insuline (100nM), 3) en présence de T3 (1.6 μ M), 4) en présence de C6 (5mM) soluble en milieu aqueux, 5) en présence d'insuline et de T3, 6) en présence d'insuline et de C6, 7) en présence de T3 et de C6 ou 8) en présence d'insuline, de T3 et de C6. Les concentrations de l'insuline, de la T3 et du C6 utilisées ont été inspirées des études menées antérieurement (Roncero et Goodridge, 1992 ; Thurmond et al, 1998 ; Radenne et al, 2008 ; Akpa et al, 2010). De nature soluble en milieu aqueux, le sodium hexanoate (C6) a été solubilisé directement dans le milieu de culture à une concentration finale de 5mM, une concentration non lipotoxique pour les hépatocytes et pour laquelle les meilleurs effets inhibiteurs de la lipogenèse sont attendus, en référence aux différentes études menées antérieurement sur les MCFA (Roncero et Goodridge, 1992 ; Thurmond et al, 1998 ; Radenne et al, 2008 ; Akpa et al, 2010). Pour les huit conditions, 2 μ Ci de [14 C]-acétate ont été ajoutés. Après 24h d'incubation, les cellules ont été récoltées puis resuspendues dans du tampon phosphate salin 1X en vue d'une extraction lipidique totale au chloroforme : méthanol (2 :1, volume : volume). Les fractions lipidiques marquées radioactivement ont été séchées par une centrifugeuse sous vide à flux d'azote puis resuspendues dans un volume adéquat (environ 1/5 du volume de chloroforme : méthanol) d'hexane. Par la suite, les différentes fractions lipidiques de chacun des échantillons ont été séparées par une chromatographie d'affinité sur couche mince de silice avec une solution d'hexane : diméthyle-éther : acide acétique (80 : 20 : 1. vol :vol :vol). Après la migration complète des fractions lipidiques révélées par la position du front de migration, les fractions lipidiques ont été localisées par une exposition aux vapeurs d'iode. Les fractions correspondant aux triglycérides ont été prélevées puis leurs niveaux de radioactivité mesurés par comptage dans un liquide à scintillation. Les taux de triglycérides synthétisés *de novo* sont exprimés en

CPM/ μ g(protéines cellulaires). Cette méthode est inspirée d'une procédure ayant été préalablement publiée (Jin et al., 1999).

2.5 Analyse de l'effet du C6 sur les niveaux de transcription des gènes *FASN* et *ACACA* :

Après sevrage, les cellules de la lignée HepG2 et les cultures primaires d'hépatocytes de rats ont été soumises 24h, dans leurs milieux de cultures spécifiques (DMEM ou DMEM/F12), aux mêmes conditions de stimulations : 1) Condition basale sans stimulation, 2) En présence de d'insuline (100nM), 3) en présence de T3 (1.6 μ M), 4) en présence de C6 (5mM), 5) en présence d'insuline et de T3, 6) en présence d'insuline et de C6, 7) en présence de T3 et de C6 ou 8) en présence d'insuline, de T3 et de C6. Après une extraction des ARN cellulaires totaux à l'aide du Trizol suivant les recommandations du fournisseur, l'ADNc a été produit par transcription inverse à l'aide du kit SuperScript II suivant les consignes du manufacturier. 1 μ g d'ADNc a été utilisé pour réaliser la quantification des niveaux de transcrits. Pour cela, une série de PCR semi quantitatives ont été réalisées avec des paires d'amorces spécifiques aux gènes humains et murins *ACACA*, *FASN* et *HPRT*. Les paires d'amorces ont été optimisées lors d'études antérieures. Les milieux réactionnels de l'étape de PCR (0,1 μ g/ μ l ADNc ; 0,2mM dNTP ; 1,5mM MgCl₂ ; 0.5 μ M d'amorces sens et antisens ; 2,5U Taq Pol Enz) ont été soumis à 30 cycles d'amplifications PCR (95°C pendant 45s puis 61°C pendant 30s et 72°C pendant 1min30s). La température d'hybridation des amorces et le nombre de cycles ont été optimisés lors des études antérieures. Les échantillons issus des réactions de PCR ont été analysés par électrophorèse sur gel d'agarose 1.2% contenant du bromure d'éthidium (1/10 000). Les bandes correspondant aux différents amplicons ont été visualisées par exposition aux U.V. et leurs intensités mesurées par densitométrie à l'aide du programme informatique Quantity One®.

2.6 Analyse de l'effet du C6 sur l'activation de la voie PI3k/Akt induite par l'insuline :

Après sevrage, les cellules de la lignée HepG2 et les cultures primaires d'hépatocytes de rats ont été cultivées 24h dans leurs milieux de cultures spécifiques (DMEM ou DMEM/F12) contenant ou non une dose lipotoxique de palmitate : BSA (2mM : 0.7mM) afin d'induire une résistance à l'insuline. Par la suite, les cellules ont été exposées ou non pendant 24h supplémentaires au C6 (5mM). En dernier lieu, les cellules ont été stimulées ou non 15 min avec 100nM d'insuline. Au total huit conditions ont donc été testées : 1) Niveau basal avec 0.7mM de BSA, 2) avec insuline et BSA, 3) avec C6 et BSA, 4) avec C6, insuline et BSA, 5) en présence de palmitate, 6) en présence de palmitate avec insuline, 7) en présence de palmitate et de C6, et enfin 8) en présence de palmitate, de C6 et d'insuline. Les protéines cellulaires totales ont alors été extraites puis solubilisées dans du tampon d'extraction protéique RIPA (25mM Tris-HCl pH 7.6, 150mM NaCl, 1% NP-40, 1% sodium déoxycholate, 0.1% SDS, 200μM sodium orthovanadate, 1mM fluorure de phénylméthylsulfonyl, 1mM AEBSF, 0.8μM aprotinine, 40μM bestatine, 14μM E-64, 20μM leupeptine et 15μM pepstatine). Après dosage protéique selon la méthode de Bradford (Bradford, 1976) les échantillons protéiques ont été dénaturés par une dilution dans un tampon réducteur (2% SDS, 2% β-mercaptoethanol, 10% glycérol, 50mg/L bleu de bromophénol, 0.1M tampon Tris-HCl pH 6.8) suivie d'une exposition à une température de 100 degrés Celsius thermiquement et chimiquement. Les échantillons protéiques dénaturés ont ensuite été soumis, à raison de 30 μg par échantillons, à une électrophorèse en condition dénaturante SDS-PAGE suivie d'un transfert sur membrane d'immobilon-P. Après une incubation d'une heure dans une solution de TBS-T contenant 5% de lait écrémé, les membranes ont été soumises à une incubation primaire durant la nuit, à 4 degrés Celsius, en présence de l'un des anticorps monoclonaux de lapin primaires suivants, dilués dans une solution TBS-T avec 5% de lait écrémé : beta-actine (1 :1000), phospho-Akt (Ser473) (1 :1000), phospho-Akt (Thr308) (1 :1000), Akt total (1 :1000), phospho-p70s6k (1 :1000), p70s6k total (1 :1000). Les membranes ont ensuite été soumises 45

minutes à une incubation secondaire en présence d'anticorps monoclonaux de chèvres anti IgG de lapin dilués à 1 :1000 dans une solution de TBS-T avec 5% de lait écrémé. Après exposition finale des membranes avec une solution de "ECL Western Chemiluminescent reagent" (Fisher Scientific) les signaux de chimiluminescence générés ont été quantifiés à l'aide du système phospho-imager (FX imager, Biorad, Mississauga, Canada). Entre chaque étape du Western Blot à partir du transfert, les membranes ont été lavées trois fois 5 minutes avec une solution de TBS-T. Les niveaux d'expression des protéines d'intérêt ont été normalisés avec les niveaux du gène codant pour la protéine beta-actine du cytosquelette.

2.7 Analyse de l'effet du C6 sur la synthèse de glycogène induite par l'insuline :

Après sevrage, les cultures primaires d'hépatocytes de rats ont été soumises, dans leur milieu de culture (DMEM/F12) aux huit conditions de cultures utilisées pour l'expérience de Western blot : 1) Niveau basal avec 0.7mM de BSA, 2) avec insuline et BSA, 3) avec C6 et BSA, 4) avec C6, insuline et BSA, 5) en présence de palmitate, 6) en présence de palmitate avec insuline, 7) en présence de palmitate et de C6, et enfin 8) en présence de palmitate, de C6 et d'insuline. Au terme de 24h d'incubation, les cellules ont été isolées puis resuspendues dans une solution de tampon phosphate salin 1X. Après une centrifugation à 800g, les culots cellulaires isolés ont été pesés à l'aide d'une balance à haute précision (Acuris instruments) avant d'être resuspendus dans du tampon d'essai fourni par un kit de dosage du glycogène cellulaire par fluorimétrie (Cayman, CAT# 700480). Les niveaux de glycogène pour chaque échantillon ont ensuite été mesurés suivant la procédure établie par le fournisseur. Les taux de glycogène, pour chaque échantillon, ont été normalisés avec les masses de culots cellulaires estimées en microgrammes.

2.8 Étude de l'effet du C6 sur l'accumulation des acides phosphatidiques totaux :

Après sevrage, les cellules de la lignée HepG2 ont été soumises ou non, dans leur milieu de culture spécifique (EMEM) à des conditions lipotoxiques en présence ou en absence de C6. Quatre conditions ont donc été testées : 1) Niveau basal avec 0.7mM de BSA, 2) avec C6 et BSA, 3) en présence de palmitate et 4) en présence de palmitate et de C6. Au terme de 24h d'incubation, les cellules ont été isolées puis resuspendues dans une solution de tampon phosphate salin 1X. Les protéines totales de 1/5 des échantillons ont alors été extraites. Pour cela les cellules ont été solubilisées dans du tampon d'extraction protéique RIPA (25mM Tris-HCl pH 7.6, 150mM NaCl, 1% NP-40, 1% sodium deoxycholate, 0.1% SDS) en vue d'un dosage protéique selon la méthode de Bradford (Bradford, 1976). Le reste des échantillons cellulaires a fait l'objet d'une extraction des lipides cellulaires totaux au chloroforme : méthanol (2 :1, volume : volume). Les acides phosphatidiques totaux contenus dans les extraits lipidiques ont finalement été mesurés à l'aide d'un kit de mesure fluorimétrique (Cayman, #700240). Les taux d'acides phosphatidiques mesurés pour chaque échantillon ont été normalisés avec les quantités de protéines cellulaires exprimées en microgrammes.

2.9 Analyses statistiques :

Au stade actuel de l'étude, les expériences basées sur deux répliques ou sur un seul essai sont considérées comme des expériences préliminaires dont seules les tendances sont interprétées, sans analyses statistiques. Les expériences basées sur au moins trois répliques ont fait l'objet d'un test statistique de Student (t-test). Pour ce test, les résultats associés à une *valeurs-p* inférieure à 0.05 sont considérés comme significatifs. Ceux dont la *valeurs-p* est supérieure à 0.05 sont considérés comme non significatifs.

CHAPITRE III

RÉSULTATS

3.1 Le C6 inhibe la synthèse des triglycérides induite par l'hormone T3 et par l'insuline dans les hépatocytes :

Des études précédentes menées notamment au sein du laboratoire du Dr. Catherine Mounier ont permis de mettre en évidence que l'hormone T3 et l'insuline exercent un effet stimulateur synergique sur l'expression du gène lipogénique *FASN* (Radenne et al, 2008). Dans la foulée de ces travaux, il a été découvert que les MCFA (C6 et C8) inhibaient l'expression des gènes *FASN* et *ME* dans des hépatocytes aviaires en culture (Roncero et Goodridge, 1992 ; Akpa et al, 2010). Dans la continuité de ces travaux il a été proposé ici d'évaluer l'impact du C6 sur le rendement lipogénique hépatocytaire traduit par le taux de synthèse de triglycérides induit par l'hormone T3 et par l'insuline. Pour ce faire, des hépatocytes issus de foies de rats Sprague Dawley ont été mis en culture et sevrés suivant la procédure décrite en méthodologie, puis incubés pendant 24h soit avec de l'insuline (100nM) ou avec de l'hormone T3 (1.6μM) ou avec les deux hormones et cela en présence ou en absence de C6 (5mM), avec ajout systématique de 2μCi de [¹⁴C]-acétate. Au terme de ces 24h d'incubation, une extraction lipidique suivie du protocole de radiométrie (tous deux décrits en méthodologie) a permis de mesurer les taux relatifs d'incorporation de ¹⁴C dans les triglycérides synthétisés (**figure 1**). Les taux mesurés dans la condition établie sans stimulation hormonale et en absence de C6 sont ramenés à 1 et définissent le niveau basal (B). Les taux représentés dans la **figure 1** pour les autres conditions sont donc comparés relativement à la condition B.

Les résultats présentés dans la **figure 1** montrent effectivement que l'insuline (I) et l'hormone T3 stimulent la synthèse des triglycérides au niveau des cultures primaires d'hépatocytes par des facteurs d'environ 1.7 et 1.25 respectivement. Quant à l'effet combiné des deux hormones ajoutées simultanément (I-T3), il se traduit ici par une augmentation significative d'un facteur de plus 2.5 de la synthèse des triglycérides. La présence du C6 seul ou en présence de l'une ou l'autre des deux hormones (C6, I-C6 ou

T3-C6) semble maintenir une activité lipogénique soutenue variant entre 1.25 et 2 fois comparée à celle de la condition B. En revanche, les résultats présentés dans la **figure 1** révèlent que la présence de C6 inhibe significativement, par un facteur de près de 2, l'effet combiné de l'insuline et de l'hormone T3 sur la synthèse *de novo* des triglycérides par les hépatocytes en culture (condition I-T3-C6). Une telle observation permet de démontrer l'effet inhibiteur du C6 sur la voie de la lipogenèse c'est-à-dire sur la synthèse des triglycérides démontrant un effet plus général du C6 par rapport à celui qui avait été montré précédemment sur le gène *FASN* (Roncero et Goodridge, 1992 ; Akpa et al, 2010). Par ailleurs, nos résultats démontrent clairement que de manière identique à ce qui avait été observé pour le gène *FASN*, l'effet inhibiteur significatif du C6 est présent seulement en présence d'insuline et de T3. De manière non significative au stade actuel des travaux, le C6 semble également inhiber légèrement la synthèse de triglycérides induite par l'insuline seule. Il est aussi à noter que la présence de C6 et T3 seuls est associée (à l'inverse) à une importante induction de la synthèse de triglycérides avoisinant celle de l'insuline. Le niveau de significativité pour ce dernier résultat n'a pu être observé.

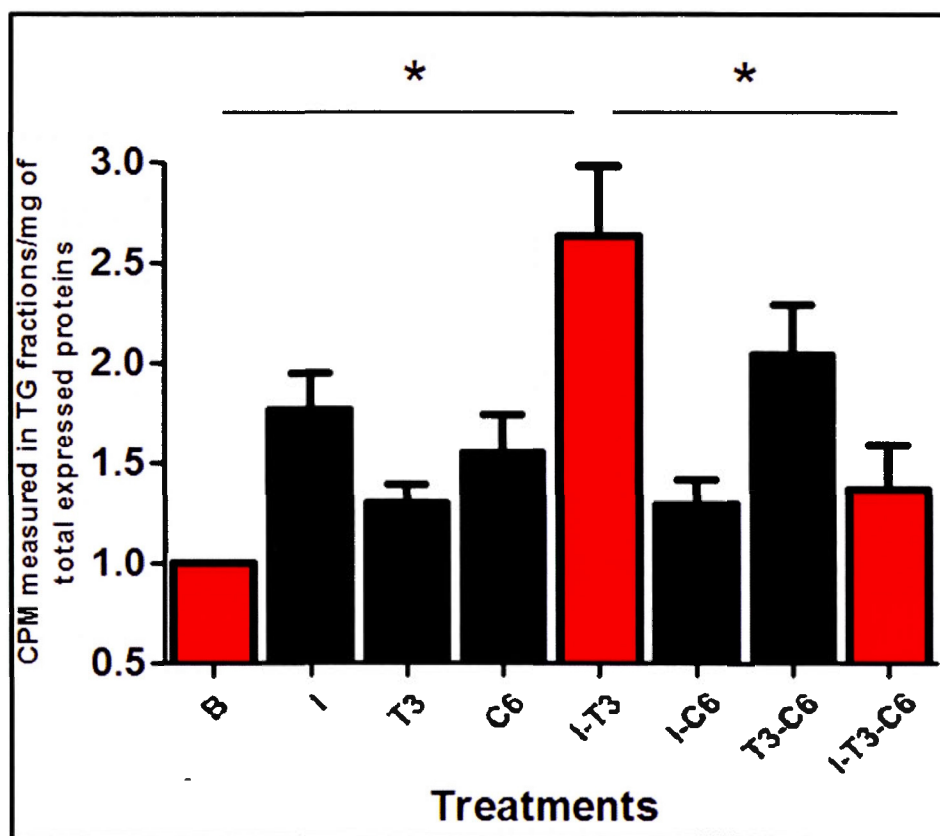


Figure 3.1 Effets du C6 sur la synthèse des triglycérides induite par l'insuline et l'hormone T3 dans des hépatocytes. Des hépatocytes primaires de rats ont été mis en culture. Les cellules ont alors été incubées durant 24h en présence ou en absence d'insuline (100nM) ou de T3 (1.6 μ M) ou en présence des deux hormones à la fois, avec ou sans C6 (5mM). Dans toutes les conditions, 2 μ Ci de [14 C]-acétate ont aussi été ajoutés durant les 24h d'incubation. Au terme du temps d'incubation, les taux d'incorporation relatifs du 14 C dans les fractions triglycériques cellulaires ont été mesurés suivant les protocoles décrits plus haut. Les résultats sont exprimés en CPM/mg de protéines et représentent la moyenne de trois expériences indépendantes. Les valeurs sont comparées au niveau basal (B) ramené à 1. Les barres d'erreurs indiquent la variabilité des données obtenues et les résultats présentant une valeur $p < 0.05$ (*) sont considérés comme significatifs. Les résultats synthétisent les données obtenues lors de trois expériences indépendantes.

3.2 Le C6 inhibe l'expression des gènes *FASN* et *ACACA* induite par l'hormone T3 et l'insuline :

Afin de compléter les observations résumées dans la **figure 1**, il a été proposé de vérifier si l'effet du C6 sur la synthèse des triglycérides était corrélé avec l'expression des deux gènes lipogéniques clefs *FASN* et *ACACA* au niveau des hépatocytes. Il a donc été question de mesurer les niveaux d'ARNm pour ces deux gènes, étant donné que les gènes impliqués dans la lipogenèse sont essentiellement régulés au niveau transcriptionnel (Strable et Ntambi, 2010). Pour ce faire, des hépatocytes issus de foies de rats Sprague Dawley (**figure 2.A**) et des cellules de la lignée HepG2 (**figure 2.B**) ont été mis en cultures et sevrés, puis soumis à des conditions similaires à celles décrites précédemment dans la **figure 1**. Les cellules ont donc été exposées pendant 24h soit à de l'insuline (100nM) ou à l'hormone T3 (1.6μM) soit aux deux hormones à la fois, en présence ou en absence de C6 (5mM). Au terme des 24h d'incubation, la mesure des niveaux d'expressions des gènes *FASN* et *ACACA* a été réalisée par RT-PCR (voir la méthodologie). Les niveaux d'expression mesurés dans la condition établie sans stimulation hormonale et en absence de C6 sont ramenés à 1 et définissent les niveaux basaux (B) (**figure 2.A et 2.B**). Les taux représentés dans les graphiques de la **figure 2** pour les autres conditions sont donc à comparer relativement à la condition B.

Les niveaux relatifs d'expression des gènes *FASN* et *ACACA* présentés en **figure 2** pour les deux types de cellules (**figure 2.A et 2.B**) et les différentes conditions de culture sont en corrélation avec les taux de synthèse des triglycérides mesurés au niveau des cultures primaires d'hépatocytes soumises à des conditions équivalentes (à comparer à la **figure 1**). Dans les cultures primaires d'hépatocytes (**figure 2.A**), l'insuline et l'hormone T3 (I et T3) stimulent l'expression des deux gènes lipogéniques par un facteur de près de 1.4 comparé à la condition B. L'effet combiné des deux hormones est alors plus élevé avec un facteur de 1.8. A ce niveau aussi l'ajout du C6 seul ou en présence de l'une ou l'autre des deux hormones (I-T3 ou I-C6) maintient un taux soutenu du niveau d'expression des gènes *FASN* et *ACACA*. Par ailleurs, il est possible

de constater à nouveau que la présence à la fois de C6 de l'insuline et de T3 simultanément (I-T3-C6) inhibe l'expression des deux gènes lipogéniques induite par les deux hormones (I-T3). L'analyse des données de la **figure 2.B** révèle que le C6 exerce des effets en tous points identiques à ceux observés pour le rendement de la lipogenèse *de novo*. De surcroît, l'effet inhibiteur de C6 sur la stimulation de l'expression du gène *FASN* induite par la combinaison des deux hormones (I-T3-C6) est ici plus importante, avec un facteur de près de 2.8, que ce qui a été observé au niveau des cultures primaires d'hépatocytes. À nouveau il est possible de constater que le C6 inhibe clairement l'expression des deux gènes induite par l'insuline seule, sans toutefois réduire l'effet de la T3 seule. Il est à noter encore que la présence de C6 seul, sans insuline et sans T3, semble plutôt favoriser la lipogenèse, ce qui fut également le cas pour le rendement de la lipogenèse *de novo* (**figure 1**). Bien qu'il ne soit pas à ce stade possible d'établir les niveaux de significativité des résultats présentés en **figure 2**, il n'en demeure pas moins intéressant d'en noter la corrélation avec ceux de la figure précédente.

Ces observations complémentaires, en adéquation avec les données découvertes précédemment (Roncero et Goodridge, 1992 ; Akpa et al, 2010), et en corrélation avec les résultats présentés en **figure1**, permettent de suggérer que le C6 réduit l'accumulation des triglycérides dans les hépatocytes, principalement en présence de l'insuline et de l'hormone T3, via l'inhibition de l'expression des gènes lipogéniques clefs par le mécanisme impliquant à la fois une voie non génomique et une voie génomique directe qui ont été mises en évidence précédemment au sein du laboratoire de Dr. Catherine Mounier et qui y sont toujours en cours d'étude (Radenne et al, 2008 ; Mémoire de maîtrise Giselle Fernandez Molina).

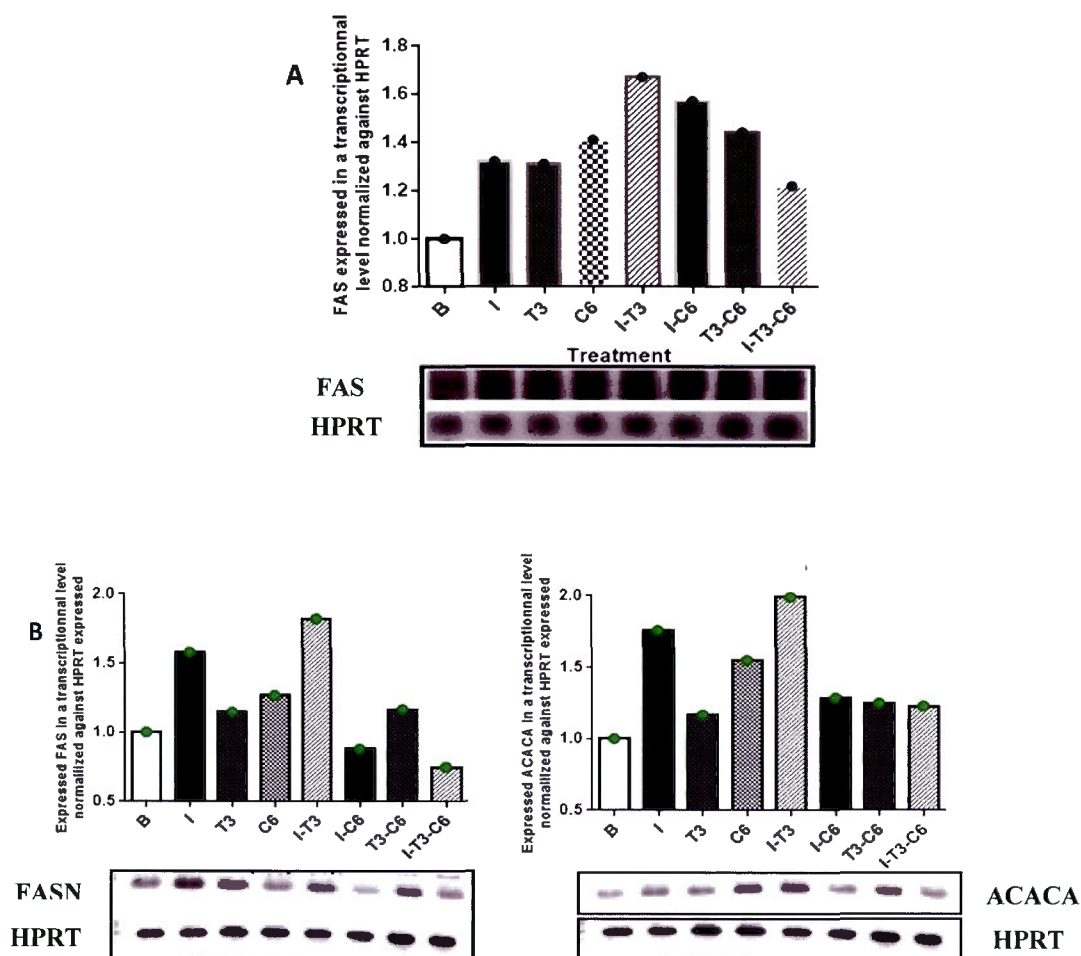


Figure 3.2 Effets du C6 sur l'expression des gènes *FASN* et *ACACA* induite par l'insuline et l'hormone T3 dans des hépatocytes. A) Des hépatocytes issus de foies de rats ont été mis en cultures. Les cultures primaires d'hépatocytes ont alors été incubées pendant 24h en présence ou en absence d'insuline (100nM) ou de T3 (1.6μM) ou en présence des deux hormones à la fois, avec ou sans C6 (5mM). Au terme des 24h d'incubation, les ARN totaux sont extraits au Trizol et les gènes *Fasn* (FAS) et *Acaca* (ACC) ont été quantifiés par RT-PCR. B) La même méthodologie a été réalisée sur des cellules de la lignée HepG2 mises en cultures. Les valeurs sont comparées au niveau basal (B) ramené à 1. Les barres d'erreurs indiquent la variabilité des données obtenues et les résultats présentant une valeur $p < 0.05$ (*) sont considérés comme significatifs. Ces résultats préliminaires sont les données obtenues au cours d'une seule expérience.

3.3 Effet du C6 sur l'activation de la voie PI3k/Akt induite par l'insuline, en conditions lipotoxiques ou non :

Après avoir démontré que le C6 pouvait limiter l'expression des gènes lipogéniques et l'accumulation des triglycérides induits par l'effet combiné de l'insuline et de la T3, ainsi que par l'insuline seule (**figures 1 et 2**), il a dès lors paru intéressant d'évaluer son effet sur la sensibilité à l'insuline, étant donné le lien existant entre l'accumulation des triglycérides et des acides gras libres et le développement de la résistance à l'insuline (Lettner et Roden, 2008). Pour ce faire, des cellules de la lignée HepG2 (**figure 3.A**) et des hépatocytes issus de foies de rats Sprague Dawley (**figure 3.B**) ont été mis en cultures et sevrés suivant les procédures détaillées en méthodologie. Les cellules en cultures ont ensuite été incubées ou non 24h en présence de palmitate : BSA (2mM : 0.7mM) (condition lipotoxique) (Dou et al, 2011 ; Jiango et al, 2006) puis 24h supplémentaires en présence ou en absence de C6 (5mM). Au terme des 48h d'incubation, les cellules ont été stimulées ou non 15 minutes avec de l'insuline (100nM). Pour toutes les conditions (lipotoxique ou non, avec ou sans C6), la sensibilité cellulaire à l'insuline a été évaluée en mesurant le niveau de phosphorylation de deux protéines kinases clefs de la voie PI3k/Akt transductrices du signal insulinémique, Akt et p70s6k (Xia et al., 2007). Ceci a été réalisé par Western blot en évaluant le niveau de phosphorylation de ces protéines, utilisant des anticorps reconnaissant spécifiquement les résidus phosphorylés cités en méthodologie (**figure3**).

Le C6 exerce des effets surprenant sur les niveaux de phosphorylation des protéines Akt et p70s6k. **La figure 3.A** montre bien qu'au niveau des cellules HepG2, la phosphorylation de la protéine Akt, induite par l'insuline, sur ses résidus Ser473 et Thr308, est considérablement diminuée en présence de palmitate : BSA (2mM : 0.7 mM), traduisant une résistance à l'insuline efficacement établie. En revanche, l'ajout de C6 aussi bien dans les conditions lipotoxiques (présence de palmitate : BSA) que non lipotoxiques (absence de palmitate : BSA) semble réduire davantage la phosphorylation de la protéine Akt induite par l'insuline sur ses résidus Ser473 et Thr308. Ces données prises individuellement pourraient suggérer des effets défavorables du C6 par rapport à

la résistance à l'insuline. Toutefois dans les cellules HepG2 (**figure 3.A**) la présence de C6 double le niveau de phosphorylation de la protéine p70s6k qui se trouve en aval d'Akt, en condition non lipotoxique et le triple en condition lipotoxique, et cela comparativement aux conditions sans C6. Des observations similaires sont également faites au niveau des cultures primaires d'hépatocytes de rats comme le montre la **figure 3.B**. Dans ces cellules, la phosphorylation de la protéine Akt, induite par l'insuline, sur son résidu Ser473, est considérablement et significativement diminuée en présence de palmitate : BSA (2mM : 0.7 mM), traduisant une résistance à l'insuline efficacement établie. Si l'ajout de C6 en condition non lipotoxique ne diminue que très légèrement la phosphorylation d'Akt sur son résidu Ser473 en présence d'insuline, il l'inhibe significativement en condition lipotoxique. Observé à des taux moindres que ceux observés dans les cellules HepG2, l'ajout de C6 aussi bien en conditions lipotoxiques que non lipotoxiques semble aussi augmenter le niveau de phosphorylation de la protéine p70s6k induit ou non par l'insuline. Il est à noter par ailleurs qu'indépendamment de la présence ou non de C6, l'ajout de palmitate semble augmenter globalement la phosphorylation de la protéine p70s6k, avec ou sans insuline, par rapport aux conditions non lipotoxiques (**Figure 3.A et 3.B**). Les valeurs présentées dans cette figure sont à comparer avec les valeurs des conditions basales ramenées à 1 (sans palmitate, sans C6 et sans insuline).

Les résultats présentés dans la **figure 3** nous ont au premier abord surpris car même si le C6 diminuait la synthèse de triglycérides au niveau hépatique, il semblait diminuer la sensibilité d'Akt à l'insuline mais augmenter celle de la p70s6K qui est située en aval. Ces résultats peuvent toutefois suggérer que C6, d'une manière qui demeure ici au stade de spéculation, pourrait activer un important intermédiaire clef situé en aval de la protéine Akt et en amont de p70s6k, à savoir le complexe mTORC1, et ainsi augmenter la sensibilité à l'insuline. Cette hypothèse est commentée plus bas dans la section "discussion".

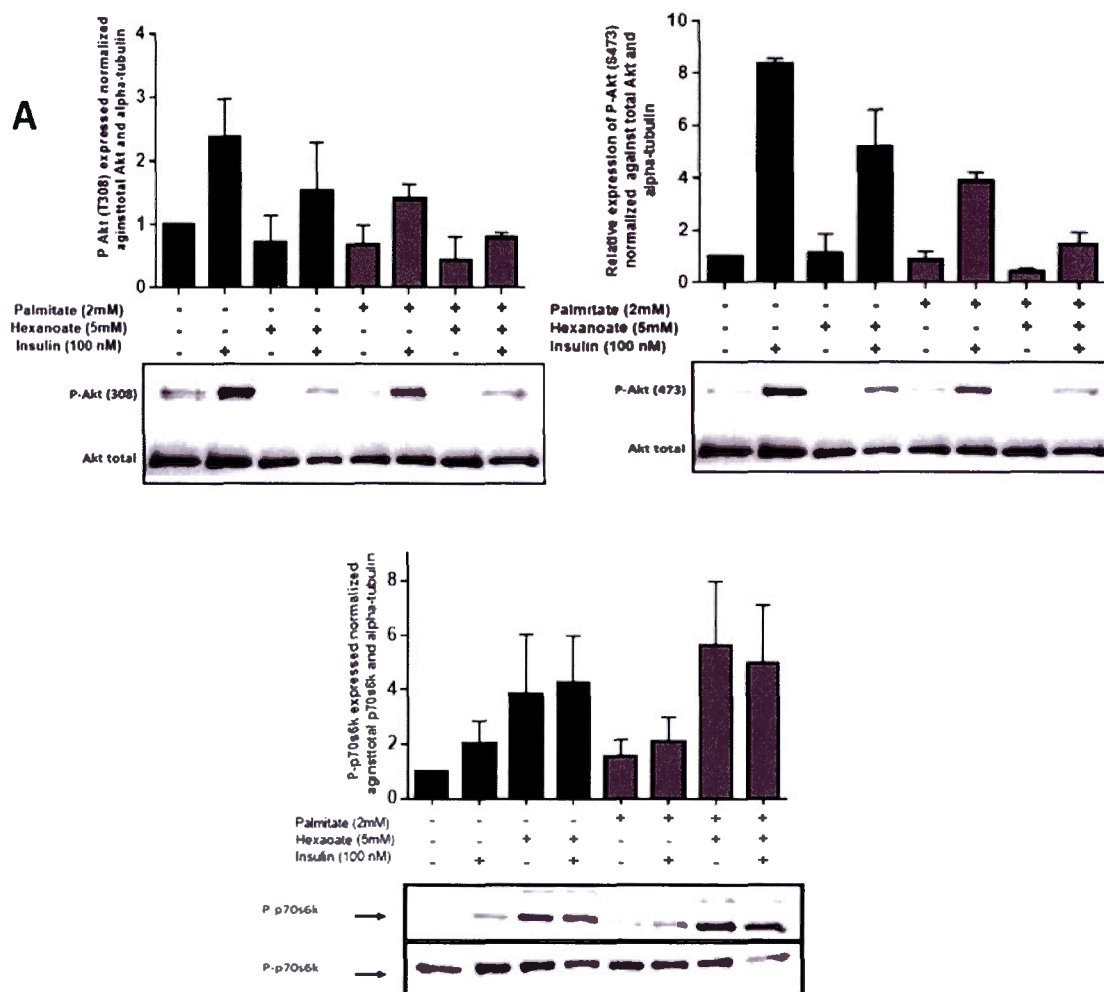


Figure 3.3 Effets du C6 sur l'activation des intermédiaires clés de la voie PI3k/Akt induite par l'insuline. A) Les cellules de la lignée HepG2 ont été mises en cultures. Les cultures cellulaires ont alors été incubées durant 24h en présence ou en absence de palmitate (2mM). Suite à l'addition ou non de C6 (5mM) durant 24h supplémentaires, les cellules ont été stimulées ou non pendant 15min avec de l'insuline (100nM). Les niveaux d'expression et de phosphorylation d'AKT et de p70S6K ont été évalués par western blot. Des anticorps primaires spécifiques aux phospho-Akt (Ser473 et Thr308), aux phospho-p70s6k, aux Akt, aux p70s6k et à la bêta-actine ont été utilisés. Les résultats sont la synthèse des données obtenues lors de deux expériences indépendantes.

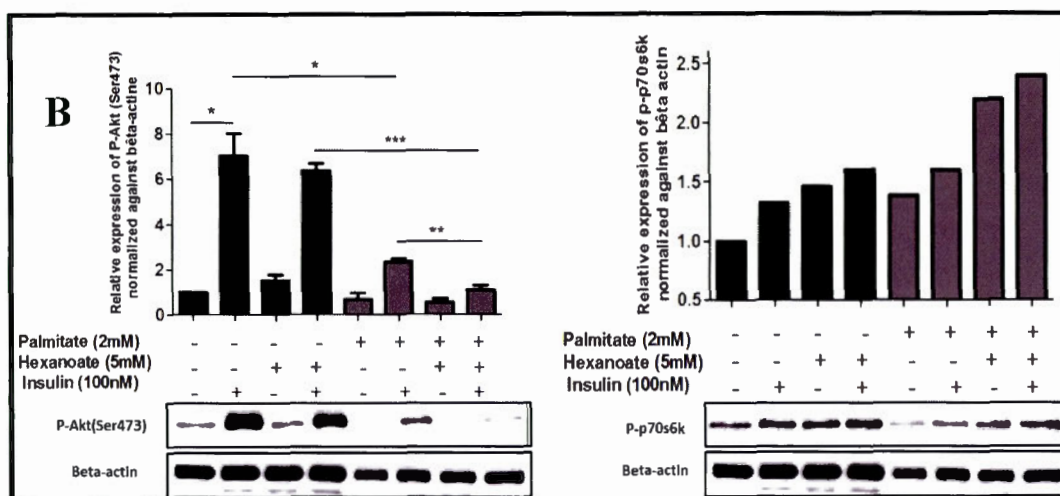


Figure 3.3 Effets du C6 sur l'activation des intermédiaires clés de la voie PI3k/Akt induite par l'insuline. B) La même procédure a été réalisée des hépatocytes issus de foies de rats et mis en cultures selon le procédé décrit plus haut. Pour les étapes de Western blot, ce sont des anticorps primaires spécifiques aux p-p70s6k, aux p-Akt (Ser473) et à la bêta-actine qui ont été utilisés à ce niveau. Les valeurs densitométriques obtenues sont comparées au niveau basal (sans palmitate, sans C6 et sans insuline) et ramenées à 1. Les barres d'erreurs indiquent la variabilité des données obtenues et les résultats présentant une valeur $p < 0.001$ (***) < 0.01 (**) < 0.05 (*) sont respectivement considérés comme très significatifs, hautement significatifs et significatifs. Les résultats sont la synthèse des données obtenues lors de deux expériences indépendantes.

3.4 La sensibilité à l'insuline des hépatocytes est accrue en présence du C6 dans des conditions lipotoxiques et non lipotoxiques :

Les résultats présentés en **figure 3** ont fait état d'une possible activation directe du complexe mTORC1 par le C6 suggérée par un effet inhibiteur sur la protéine Akt et un effet activateur sur la protéine p70s6k. Ces résultats ne pouvaient donc pas apporter à eux-seuls une indication suffisante pour vérifier ou infirmer l'hypothèse d'un impact positif du C6 sur la sensibilité à l'insuline des hépatocytes soumis à une lipotoxicité. Il a donc été proposé de vérifier à la suite de cela l'impact du C6 sur la synthèse du glycogène (un indicateur fiable de la sensibilité à l'insuline) par les cellules hépatocytaires soumises aux mêmes conditions de cultures.

Pour ce faire, des hépatocytes issus de foies de rats Sprague Dawley (**figure 4**) ont été mis en culture et sevrés suivant les procédures spécifiques détaillées en méthodologie.

Les cellules en cultures ont ensuite été incubées ou non 24h en conditions lipotoxiques en présence de palmitate : BSA (2mM : 0.7mM) (Chen et al., 2006, Dou et al., 2011) puis 24h supplémentaires en présence ou en absence de C6 (5mM). Au terme des 48h d'incubation, les cellules ont été stimulées ou non pendant 4h avec de l'insuline (100nM) pour induire la synthèse de glycogène (Gao et al., 2010) Le glycogène est alors extrait des cellules (voir méthodologie) et son niveau mesuré au moyen d'un kit fluorimétrique fournit par Cayman (voir la référence commerciale dans la méthodologie) conformément aux consignes du fournisseur.

Les résultats présentés en **figure 4** montrent d'abord que la synthèse de glycogène est significativement augmentée par un facteur 1.5 en présence d'insuline en condition non en absence de palmitate et de C6. Cet effet est abrogé en condition lipotoxique, confirmant l'établissement d'une insulino-résistance déjà traduite par la perte de la phosphorylation de la protéine Akt (**figure 3**). Dans un second temps, il est possible de constater que la présence de C6 augmente considérablement (par un facteur de 2.5) la synthèse de glycogène induite par l'insuline en condition non lipotoxique et qu'elle l'augmente de manière très significative (par un facteur identique) en condition lipotoxique (**figure 4**). Cette seconde observation est, elle, corrélée au gain de phosphorylation mesuré pour la protéine p70s6k (**figure 3**) en présence de C6 dans les deux conditions lipotoxique et non lipotoxique.

Les analyses conjuguées des résultats fournis par les **figures 3 et 4** permettent d'avancer avec une plus grande certitude que le C6 accroît la réponse cellulaire des hépatocytes à l'insuline en activant, par un mécanisme à explorer, la phosphorylation de la protéine p70s6k tout en entraînant l'inhibition de la protéine Akt.

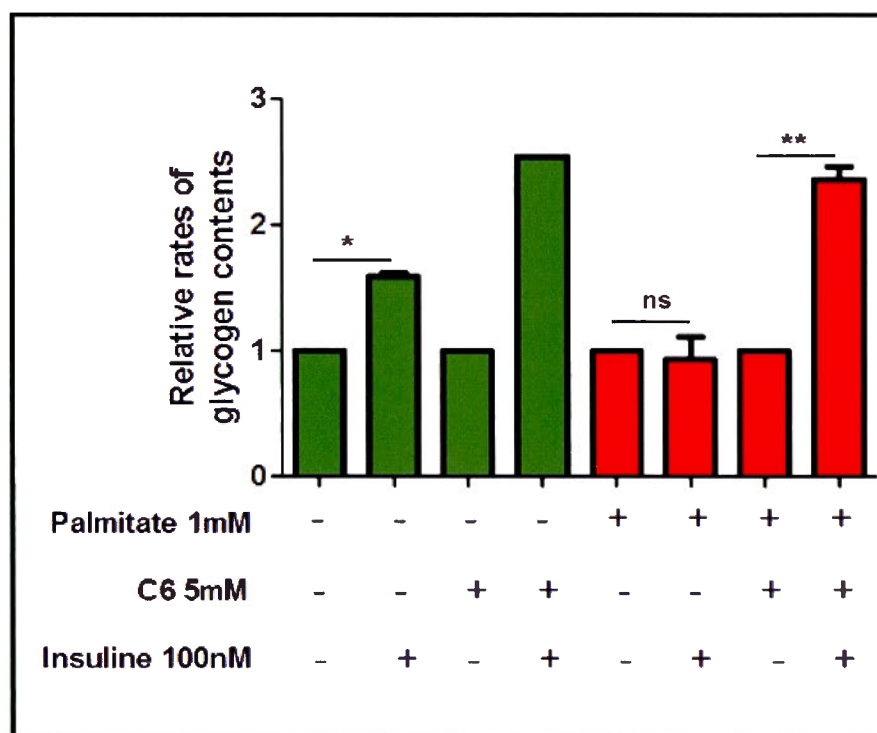


Figure 3.4 Effets du C6 sur l'activité glycogénique induite par l'insuline en conditions lipotoxiques ou non. Des hépatocytes issus de foies de rats ont été mis en cultures. Les cultures cellulaires ont alors été incubées durant 24h en présence ou en absence de palmitate (2mM). Suite à l'addition ou non de C6 (5mM) durant 24h supplémentaires, les cellules ont été stimulées ou non pendant 4h avec de l'insuline (100nM). Le glycogène a été extrait puis mesuré à l'aide d'un kit fluorimétrique "glycogen snthesis" de Cayman (voir la référence commerciale dans la méthodologie). Les valeurs obtenues ont été normalisés en $\mu\text{g}(\text{glycogène})/\text{mg}$ de culots cellulaires (résultats ne figurant pas ici). Les valeurs présentées ici pour chaque condition avec insuline sont des valeurs relatives se rapportant à celles des conditions similaires sans insuline ramenées à 1. Les barres d'erreurs indiquent la variabilité des données calculées et les résultats présentant une valeur $p < 0.01$ (**) < 0.05 (*) sont respectivement considérés comme hautement significatifs. Les résultats non significatifs présentent une valeur p (ns) > 0.05 . Les résultats sont la synthèse des données obtenues lors de trois expériences indépendantes.

3.5 L'augmentation de la sensibilité à l'insuline associée au C6 n'implique pas l'acide phosphatidique en guise d'intermédiaire métabolique :

Outre la simple constatation du potentiel du C6 à accroître la sensibilité à l'insuline des hépatocytes, nous avons souhaité déterminer le mécanisme cellulaire potentiel de son action. Sur la base de l'hypothèse selon laquelle C6 pourrait d'une manière ou d'une autre causer la stimulation des protéines p70s6k par une action sur mTORC1 indépendante de la voie de signalisation PI3k/Akt, il a été proposé de vérifier si l'ajout de C6 pouvait augmenter les taux d'acide phosphatidique dans les hépatocytes. Cet intermédiaire de l'anabolisme des acides gras libres et du catabolisme des triglycérides, mentionné dans l'état des connaissances, a été impliqué dans l'activation nutritionnelle directe du complexe mTORC1 (Foster et al, 2014).

Pour ce faire, des cellules de la lignée HepG2 ont été mises en cultures et sevrées suivant la procédure spécifique détaillée en méthodologie. Les cellules en culture ont ensuite été incubées ou non 24h en condition lipotoxique en présence de palmitate : BSA (2mM : 0.7mM) puis 24h supplémentaires en présence ou en absence de C6 (5mM). Au terme des 48h d'exposition, les niveaux cellulaires d'acides phosphatidiques totaux ont été mesurés pour chaque condition selon la procédure expliquée en méthodologie et résumée en légende de la **figure 5**. Les valeurs mesurées sont à comparer avec celle de la condition de base (sans palmitate, sans C6 et sans insuline) ramenée à 1.

Les résultats présentés en **figure 5** montrent que la présence du C6 dans le milieu de culture n'augmente pas significativement les niveaux cellulaires d'acides phosphatidiques totaux, et cela aussi bien en condition lipotoxique (avec palmitate : BSA) qu'en condition non lipotoxique. En revanche, la **figure 5** montre que la présence de palmitate (condition lipotoxique), augmente significativement et par facteur de 2 les niveaux cellulaires d'acides phosphatidiques totaux, cela permettant de valider le bon fonctionnement de l'expérience, car les LCFA internalisés par la cellule sont en grande partie estérifiés dans le but de produire entre autres des triglycérides, avec donc de l'acide phosphatidique comme intermédiaire (Foster et al., 2014, Guo et al., 2009, Kohlwein et al., 2013).

Les deux principales observations tirées de l'analyse de la **figure 5** permettent d'avancer deux explications dont les implications sont discutées plus bas. D'abord l'acide phosphatidique ne semble pas être un intermédiaire métabolique clef dans la présumée capacité du C6 à induire une activation directe sur le complexe mTORC1 indépendante de la voie PI3k/Akt. Ensuite, le fait que l'addition de C6 n'entraîne pas d'accumulation d'acide phosphatidique à l'inverse du palmitate suggère fortement que les MCFA libres sont beaucoup moins mobilisés que les LCFA libres pour la synthèse des triglycérides au niveau des hépatocytes. En effet, l'acide phosphatidique est, pour rappel, un intermédiaire de la voie d'estérification des acides gras libres menant à la synthèse des triglycérides (Coleman et Mashek, 2011 ; Foster et al, 2014).

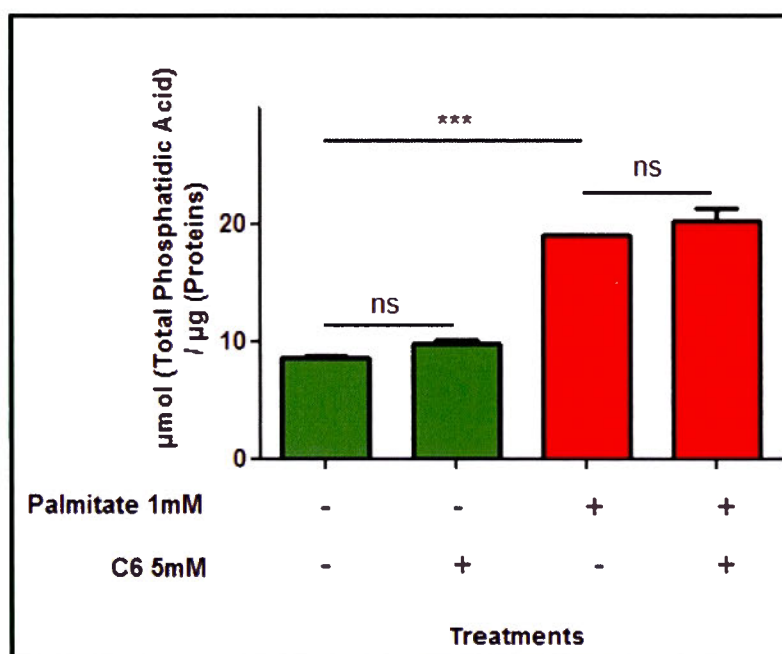


Figure 3.5 Effet d'un milieu enrichi en C6 sur le contenu cellulaire en acide phosphatidique, comparativement à un milieu enrichi en palmitate. Des cellules de la lignée HepG2 ont été mises en culture. Les cultures cellulaires ont alors été incubées durant 24h en présence ou en absence de palmitate (2mM), puis 24h supplémentaires en présence de C6 (5mM). Au terme des 48h d'incubation, l'acide phosphatidique a été mesuré en utilisant un kit commercial (Cayman). Les quantités d'acide phosphatidique mesurés pour chaque échantillon ont été normalisées puis présentés ici en $\mu\text{mol}/\mu\text{g}$ de protéines cellulaires. Les résultats présentant une valeur p (***) < 0.001 sont considérés comme très significatifs et ceux avec p -value (ns) > 0.05 ne sont pas significatifs. Les résultats sont la synthèse des données obtenues lors de trois expériences indépendantes.

CHAPITRE IV

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

Les MCFA (acides gras à chaînes moyennes) possèdent des propriétés biochimiques se traduisant par des effets métaboliques les distinguant fondamentalement de celles des LCFA saturés (Acides gras à longues chaînes). Ayant auparavant fait l'objet de plusieurs études au sujet de leurs effets métaboliquement bénéfiques – certaines d'entre elles seront mentionnées dans ce qui suit – les MCFA, et plus précisément le C6, sont étudiés ici. La présente étude se propose d'examiner le potentiel du C6 à limiter le rendement de la voie de la lipogenèse *de novo*, et à améliorer la sensibilité à l'insuline des cellules hépatiques de rats et des cellules de la lignée HepG2, deux modèles d'études fiables pour l'étude du métabolisme hépatique des lipides.

4.1 Effet inhibiteur du C6 sur la voie de la lipogenèse *de novo* et de la synthèse des triglycérides dans les hépatocytes :

4.1.1 Remise en contexte de l'étude avec la théorie :

Le premier volet de notre étude a consisté à tester la première hypothèse selon laquelle les MCFA, et plus exactement le C6, étaient des inhibiteurs potentiels de la lipogenèse induite par l'insuline et/ou l'hormone T3 dans les hépatocytes. Cette hypothèse a été basée sur une série de travaux antérieurs, menés pour certains d'entre eux au sein du laboratoire du Dr. Catherine Mounier, et qui ont permis de mettre clairement en évidence l'effet inhibiteur des MCFA sur les niveaux d'expression de plusieurs gènes lipogéniques (Roncero et Goodridge, 1992 ; Hillgartner et Charron, 1997 ; Thurmond et al, 1998 ; Akpa et al, 2010). En voici un bref résumé en guise de mise en contexte.

Tout d'abord, Roncero et Goodridge ont démontré à travers une étude publiée en 1992 et réalisée sur des cultures d'hépatocytes d'embryons aviaires, que les SCFA (acides gras à courtes chaînes) comme le butanoate, tout comme les MCFA, en l'occurrence le C6 et le C8 (l'octanoate) réduisaient significativement l'activité des enzymes *FASN* et *EM* induite par l'hormone T3. Le C6 et le C8, en présence de l'hormone T3, inhibaient également l'expression transcriptionnelle des gènes *FASN* et *EM*, tandis que l'hormone T3 seule augmentait par un facteur 30 le taux de transcription des deux gènes (Roncero et Goodridge, 1992). En comparaison, les LCFA et les acides gras modifiés chimiquement (comme les acides gras ramifiés) n'induisaient que peu voir pas d'effets sur l'expression des deux gènes (Roncero et Goodridge, 1992). En revanche, l'ajout du 2-bromo-octanoate, une forme d'octanoate non métabolisable en raison de sa transformation irréversible en 2-bromo-3-ketooctanoyl-CoA dans la cellule, n'exerçait pas d'effet visible sur le niveau d'expression des gènes *FASN* et *EM*. Ceci suggérait dès lors que des dérivés métaboliques des MCFA étaient vraisemblablement impliqués dans l'inhibition de l'expression des deux gènes (Roncero et Goodridge, 1992). Quelques années plus tard, en 1997 Hillgartner et Charron ont démontré dans des cultures primaires d'hépatocytes aviaires que le C6 et le C8, à des concentrations de 1mM, inhibaient rapidement (en deux heures) l'activité et l'expression de l'enzyme ACACA au niveau transcriptionnel (Hillgartner and Charron, 1997). Leur étude conclut aussi que des dérivés métaboliques du C6 et du C8, sans doute des chaînes d'acyl-CoA longues de 6 ou 8 atomes de carbone étaient impliqués dans la régulation nutritionnelle de l'expression du gène lipogénique ACACA codant pour l'enzyme ACACA (Hillgartner and Charron, 1997). Peu après, Thurmond et ses collaborateurs en 1998 se sont intéressés à nouveau aux effets inhibiteurs des MCFA sur l'expression des gènes *FASN* et *EM* induite par l'hormone T3 sur les hépatocytes d'embryons aviaires. Leur étude permit en plus d'apprendre que les MCFA ou leurs dérivés métaboliques inhibaient l'activité transactivatrice du récepteur à l'hormone T3 (TR) sans altérer directement l'affinité de la T3 avec son récepteur TR ni celle du TR avec les éléments de réponse à la T3 (T₃RE) régulant l'expression des gènes effecteurs (Thurmond et al, 1998). Les

résultats de cette étude permettaient de postuler que les MCFA ou leurs métabolites inhiberaient la transcription de certains gènes effecteurs en régulant certains facteurs (non identifiés dans cette étude) qui interagiraient avec le récepteur TR (Thurmond et al., 1998). S'il est depuis longtemps admis que l'insuline stimule l'expression des gènes lipogéniques via l'activation de la voie PI3k/Akt de la manière détaillée dans l'état des connaissances (Kersten, 2001 ; Capeau, 2003 ; Laplante and Sabatini, 2010), ce n'est que tout récemment que fut élucidé de manière fiable par Radenne et ses collaborateurs du laboratoire du Dr. Catherine Mounier le mécanisme moléculaire sous-jacent à l'effet stimulateur de la T3 sur l'expression du gène lipogénique *FASN* impliquant les séquences T₃RE qui gouvernent entre autres l'expression du gène *FASN* (Radenne et al, 2008). L'étude a montré que la T3 cible les régions T₃RE par une action génomique directe en liant le complexe RXR/TR pour augmenter son affinité avec les régions T₃RE. En parallèle, cette étude a révélé que l'hormone était capable d'activer la transcription du gène *FASN* par une action non génomique par l'activation d'une voie de signalisation impliquant la PI3k et les MAPK dont Erk_{1/2} (Radenne et al, 2008). Une étude en cours au sein de notre laboratoire permet d'ailleurs de postuler que l'activation de cette voie de signalisation par l'hormone T3 impliquerait en aval de la PI3k l'activation des récepteurs β -intégrine activant par la suite les protéines kinases SRC (Mémoire de maîtrise de Giselle Fernandez Molina, 2014). De plus les travaux d'Anne Radenne au laboratoire du Dr. Catherine Mounier ont aussi démontré que l'insuline et l'hormone T3, du fait de la convergence de leurs voies non génomiques respectives couplée à l'activation génomique directe de la T3 en plus de la voie non génomique spécifique à l'insuline, exercent un effet synergique important sur l'activation de l'expression du gène *FASN* et de son activité enzymatique (Radenne et al, 2008). Il a aussitôt été rapporté, dans une étude menée à la suite de celle-ci par une autre étudiante à la maîtrise au laboratoire sur des cultures primaires d'hépatocytes aviaires et des cellules HepG2, que le C6 et le C8 inhibaient fortement et significativement l'activation synergique induite par l'insuline et l'hormone T3 sur l'expression et l'activité du gène *FASN*, comme mentionné plus haut (Akpa et al, 2010). Il fut aussi intéressant de noter que

l'inhibition entraînée par le C6 et le C8 n'était significative qu'en présence d'insuline et de T3 simultanément (Akpa et al, 2010). De plus, cette étude a permis de confirmer l'hypothèse relayée par les études antérieures, à savoir que les MCFA devaient nécessairement être transformés en dérivés acyl-CoA pour provoquer cette inhibition (Akpa et al, 2010 ; Roncero et Goodridge, 1992 ; Hillgartner et Charron, 1997). Les résultats de la présente étude montrent par ailleurs que l'effet de l'insuline seule est inhibé en présence de C6. En effet, l'action inhibitrice du C6 fut abolie lorsqu'il était administré aux cellules sous forme de bromohexanoate (voir l'utilisation du bromooctanoate expliquée plus haut dans la section) ou en présence de Triacsine-C, un inhibiteur général des acyl-CoA synthétases (Akpa et al, 2010).

4.1.2 Le C6 limite la lipogenèse dans certaines conditions conformément aux données de la littérature :

Ce sont donc toutes ces données de la littérature qui nous ont conduits ici à formuler l'hypothèse du premier volet de l'étude, selon laquelle le C6 pourrait inhiber le rendement de la lipogenèse *de novo* en présence d'insuline et de T3. Afin de tester cette première hypothèse, des cellules de la lignée HepG2 et des cultures primaires d'hépatocytes de rats ont été stimulées ou non par l'insuline et/ou par la T3 en présence et en absence de C6. Les effets des différentes conditions de stimulation ont été analysés sur le taux de synthèse des triglycérides et l'expression du gène *Fasn* dans des hépatocytes de rats et sur l'expression des gènes *FASN* et *ACACA* dans les cellules de la lignée HepG2. Les résultats obtenus montrent clairement que l'insuline et l'hormone T3 induisent séparément la synthèse de triglycérides par un facteur clairement significatif de 1.5 tandis que l'effet combiné des deux hormones l'augmente par un facteur de 2.5 (figure 1 de la section résultats). L'addition du C6 diminue significativement et par un facteur de 2 la synthèse des triglycérides induite par la combinaison de l'insuline et de la T3 dans les hépatocytes de rats en cultures (figure 1 de la section résultats). La synthèse des triglycérides est corrélée avec l'expression au

niveau transcriptionnel des gènes lipogéniques *FASN* et *ACACA* dans les hépatocytes de rats et les cellules HepG2 soumises à des conditions de cultures identiques (figure 2 de la section résultats). L'inhibition exercée par le C6 tant sur la synthèse de triglycérides que sur l'expression des deux gènes lipogéniques n'est significative qu'en présence des deux hormones insuline et T3 simultanément. La reproduction des résultats avec un plus grand nombre d'expériences permettra de déterminer si l'effet inhibiteur du C6 sur l'insuline est significatif. L'activation induite par l'insuline et l'hormone T3 peut paraître relativement faible au regard des données de la littérature publiées pour la plupart par l'équipe du Dr. Goodridge, mais il est important de noter aussi que nos expériences n'ont pas été réalisées dans des hépatocytes aviaires, mais dans des hépatocytes de rats et dans des cellules de la lignée cellulaire humaine HepG2. Ces observations demeurent toutefois en adéquation totale avec ce qui a été démontré précédemment au sujet des effets du C6 et du C8 sur l'activité de l'enzyme FASN et l'expression du gène codant pour cette enzyme (Akpa et al, 2010 ; Thurmond et al, 1998). Mieux encore, l'avancée que représentent les résultats obtenus au cours de la présente étude (figures 1 et 2 de la section résultats) réside dans la preuve de la capacité du C6 à exercer un effet inhibiteur sur l'ensemble de la voie de la lipogenèse *de novo* – c'est-à-dire sur la synthèse des triglycérides – démontrant un effet plus général du C6 que ce qui avait été rapporté jusque-là sur les gènes *FASN*, *ACACA* et *EM* (Roncero et Goodridge, 1992 ; Hillgartner et Charron, 1997 ; Thurmond et al, 1998 ; Akpa et al, 2010).

4.1.3 Suggestion d'une base mécanistique expliquant l'inhibition de la lipogenèse *de novo* provoquée par le C6 lors d'un traitement hormonal :

Au niveau mécanistique nos résultats au laboratoire suggèrent que le C6 pourrait moduler certains intermédiaires de la voie de signalisation commune à la voie non génomique de la T3 et à la voie classique de l'insuline. Si cette hypothèse a déjà été suggérée au laboratoire précédemment (Akpa et al, 2010) nos résultats obtenus ici au

cours de la présente étude la consolident fortement. En outre, cette explication est en accord avec de plus en plus d'études faisant état de la capacité des MCFA et de métabolites similaires à moduler des voies de signalisations cellulaires. Parmi ces métabolites l'on peut nommer les SCFA et les corps cétoniques. (Kimura et al, 2011; Wang et al, 2006 ; Mémoire de maîtrise de Giselle Fernandez Molina, 2014). En 2006 il a été montré sur des lignées cellulaires lymphoïdes que les MCFA libres pouvaient agir comme des ligands naturels du récepteur aux protéines G (GPCR) orphelin GPR84 *via* lequel ils activent plusieurs réponses cellulaires (Wang et al., 2006). Les MCFA libres exercent les mêmes effets sur les cellules nerveuses du ganglion sympathique (Kimura et al., 2011). Il a effectivement été démontré que le propionate (un SCFA long de 3 atomes de carbone), l'octanoate et les corps cétoniques stimulent le métabolisme énergétique des cellules nerveuses en modulant la voie des MAPK *via* l'activation du récepteur GPCR GPR41 (Kimura et al, 2011). Cela conforte donc l'éventuelle hypothèse d'un possible effet du C6 induit par son interaction avec des éléments de signalisation (une étude est d'ailleurs en cours de réalisation dans notre laboratoire autour de cette hypothèse). Étant donné la forte propension des cellules hépatiques à convertir en corps cétoniques (en guise de sources d'énergies alternatives au glucides) les acides gras incluant les MCFA, surtout dans des conditions de sevrage qui furent reproduites dans nos cultures cellulaires (Sharma et al, 2014 ; Kimura et al, 2011), il est possible de penser que les hépatocytes incubés avec du C6 aient accumulé des taux importants de corps cétoniques et de MCFA libres à même de moduler les éléments de certaines voies signalétiques. Plus exactement, et dans le même ordre d'idée, une étude non encore publiée menée dans notre laboratoire suggère que le C6 pourrait inhiber par interaction directe certains éléments de la voie de signalisation β -intégrine/Src kinase activée par l'insuline et l'hormone T3. La validation d'une telle observation corroborerait parfaitement avec les résultats présentés ici étant donné que les éléments de la famille des kinases Src sont impliqués dans diverses fonctions anaboliques (Thomas and Brugge, 1997).

Par ailleurs, il a été démontré que les corps cétoniques et les diètes dites ‘‘cétogéniques’’ qui favorisent la biosynthèse de corps cétoniques (des diètes avec un apport en carbohydrates : protéines d’un ration de 6 :1, p :p) inhibent l’activité de la protéine kinase mTOR qui est, à titre de rappel, est la principale activatrice du facteur SREBP-1c, un puissant régulateur de la lipogenèse *de novo* (McDaniel et al., 2011). Dans une étude précédente l’équipe du Dr. Catherine Mounier a d’ailleurs clairement suggéré que ‘‘les MCFA pourraient agir via des GPCR causant la phosphorylation et l’inactivation des facteurs de transcriptions liées aux T₃RE’’ (Radenne et al., 2008, Akpa et al., 2010). Cet événement pourrait être en cause dans l’inhibition engendrée par le C6 sur l’activation de la lipogenèse *de novo* induite par l’insuline et l’hormone T3. En parallèle, une autre étude en cours de finalisation est sur le point de démontrer que les MCFA pourraient agir de la sorte en bloquant l’activation par la T3 de la voie β -intégrine/SRC (Mémoire de maîtrise de Giselle Fernandez Molina, 2014).

Par ailleurs, une récente étude a montré que l’administration d’acide alpha-linoléique (ALA), un lipide bioactif, à des souris de souche sauvage, de type AMPK α 1^{-/-} ou AMPK α 2^{-/-} entraînait au niveau adipeux une chute de la lipogenèse et une hausse du catabolisme lipidique d’une manière tributaire de l’activation de l’AMPK α 1/ α 2, selon un mécanisme qui reste à explorer (Zhou et al., 2015). Étant donné les capacités communes du C6 et de l’ALA à inhiber la lipogenèse tout en favorisant le catabolisme des lipides, il serait intéressant d’étudier si les effets du C6 observés ici suivent un mécanisme semblable. Il serait pour cela intéressant d’évaluer par immunobuvardages de type Western les niveaux de phosphorylation de l’AMPK α 1/ α 2 dans les cultures d’hépatocytes en présence ou non de C6 et/ou d’insuline et/ou de T3.

Ce recoupement des résultats avec ceux de la littérature montre que plusieurs bases mécanistiques sont potentiellement impliquées dans les effets antilipogéniques du C6.

4.1.4 Conformité des résultats de l'étude avec les implications cliniques attendues et les études menées *in-vivo* :

Outre l'intérêt strictement fondamental de la compréhension des mécanismes via lesquels les MCFA inhibent la lipogenèse induite par l'insuline et la T3, il est fort utile de revenir à son implication clinique et nutritionnelle. Les résultats observés ici sur des cultures d'hépatocytes semblent en harmonie avec certaines études menées par d'autres équipes *in-vivo* sur des animaux (Arunima and Rajamohan, 2014, Lavau and Hashim, 1978). La plupart des effets métaboliquement bénéfiques exercés par les MCFA sont énumérés dans l'état des connaissances. Mais il est intéressant d'établir un parallèle entre certaines études et les résultats obtenus dans la présente recherche. Par exemple, il a été rapporté que des rats nourris avec une diète enrichie en MCT, contrairement à des rats nourris avec des diètes enrichies en LCT ou en huiles de maïs, présentent au bout de quelques semaines une baisse de 10% de leur masse corporelle associée à une baisse de 40% de leurs masses adipocytaires épидидymique et périrénale. Au niveau hépatique ces baisses sont corrélées à une perte de près de 70% des activités enzymatiques de la plupart des enzymes lipogéniques, nommément ACLY, ACACA, ME, FASN et G6PD (Lavau and Hashim, 1978).

Une autre étude a aussi été menée sur un groupe de rats nourris avec de l'huile de noix de coco vierge, la principale source en MCT dans la nature, ou avec de l'huile de graines de tournesol plutôt riche en LCT (Arunima and Rajamohan, 2014). Au bout de quelques semaines, la diète enrichie en huile de noix de coco, contrairement à celle du second groupe, a entraîné une chute significative de 20% à 30% du niveau d'expression et d'activité hépatiques des protéines ACACA, FASN et SREBP-1c associée à une baisse significative de l'accumulation des lipides dans les cellules hépatiques et de la concentration des acides gras libres circulants. Ce traitement a aussi entraîné une hausse de l'expression des gènes impliqués dans le catabolisme des lipides, la lipolyse et la β -oxydation (Arunima and Rajamohan, 2014). Les auteurs suggèrent dans leur discussion que les diètes à base d'huiles de noix de coco réduisent les risques de maladies cardiovasculaires en régulant l'homéostasie de l'anabolisme et du catabolisme des

lipides. Les auteurs accordèrent toutefois aux polyphénols et à la vitamine E, présents en grandes quantités dans la noix de coco, leur part d'importance dans ces processus. (Arunima and Rajamohan, 2014).

Ces données montrent donc bien que les résultats obtenus à ce stade de l'étude s'inscrivent dans une dynamique de recherche cohérente axée sur les intérêts fondamentaux et cliniques suscités par la mise en évidence des effets inhibiteurs des MCFA sur la lipogenèse.

4.2 Analyse de l'effet bénéfique mais complexe du C6 sur la sensibilité à l'insuline dans les hépatocytes :

Le second volet de l'étude a consisté à tester l'hypothèse d'un impact positif du C6 sur la sensibilité à l'insuline des hépatocytes et, le cas échéant, d'identifier les mécanismes en cause. Cette hypothèse a été proposée au regard des résultats discutés précédemment mais également au regard de certaines données de la littérature.

4.2.1 Remise en contexte de l'étude avec la théorie :

En bref, comme il l'a été décrit plus en détail dans l'état des connaissances, le dépôt ectopique des graisses, la lipotoxicité, l'accumulation des triglycérides et des acides gras libres dans les hépatocytes, le tout associé à une augmentation de la synthèse des cytokines proinflammatoires et des marqueurs du stress du réticulum endoplasmique, engendrent la résistance à l'insuline (Gao et al, 2010 ; Lettner et Roden, 2008 ; Capeau, 2003). Au niveau physiologique d'autres facteurs, qui ne peuvent pas être pris en compte ici, affectent la sensibilité à l'insuline (voir l'état des connaissances). (Lettner et Roden, 2008 ; Nagao et Yanagita, 2008 ; Haslam et James, 2005). Au niveau des cellules hépatiques et autres cultivées *in-vitro* ou *ex-vivo*, la résistance à l'insuline se

caractérise en présence d'insuline, par une perte importante de l'internalisation du glucose (Lettner et Roden, 2008), une chute drastique de la synthèse du glycogène (Lettner and Roden, 2008) et une perte de l'activation des éléments clefs de la voie de signalisation PI3k/Akt incluant précisément la protéine kinase Akt (Xia et al., 2007, Mayer and Belsham, 2010). Or, les résultats obtenus au cours de la présente étude, et discutés dans la sous-section précédente, démontrent que le C6 inhibe la lipogenèse *de novo* et la synthèse des triglycérides induites par l'insuline et l'hormone T3. Il devient donc intéressant de se questionner sur le potentiel du C6 à améliorer la sensibilité à l'insuline des hépatocytes soumis à des conditions lipotoxiques. Nos résultats sont en accord avec les propriétés métaboliquement bénéfiques préalablement décrits incluant une amélioration de la sensibilité à l'insuline et de la tolérance au glucose chez des individus (humains ou animaux) atteints d'obésité, de NAFLD et de diabète de type 2 (Wein et al, 2009 ; Marten et al, 2006 ; Nagao and Yanagita, 2008).

4.2.2 Le C6 inhibe Akt et active p70s6k : quelle conclusion est à tirer pour son effet sur la sensibilité à l'insuline ?

Afin de tester la seconde hypothèse de l'étude, à savoir que le C6 pourrait améliorer la sensibilité des hépatocytes, des cellules de la lignée HepG2 et des cultures primaires d'hépatocytes de rats ont été soumises ou non 24 h à des conditions lipotoxiques, soit en présence de 2mM de palmitate, puis exposées ou non 24h supplémentaires au C6 (5mM) (**figure 3 de la section résultats**). Après une brève stimulation à l'insuline, l'effet sur la sensibilité à l'insuline de ces traitements sur les deux types cellulaires (**figure 3.A et 3.B de la section résultats**) a été déterminé dans un premier temps par la mesure du niveau de phosphorylation de la protéine Akt (Ser473 et Thr308). En bref, la présence de palmitate a considérablement inhibé la phosphorylation d'Akt (Ser473 et Thr308) induite par l'insuline au niveau des cellules HepG2 et l'a également significativement réduite (Ser473) au niveau des cultures primaires d'hépatocytes de

rats (**figure 3.A et 3.B de la section résultats**). Cette première constatation a permis de confirmer l'efficacité de l'induction expérimentale de la résistance à l'insuline.

Des travaux menés par d'autres équipes montrent bien que des concentrations de palmitate variant entre 0.4 et 1.7mM (donc du même ordre de grandeur que celle utilisée dans notre étude) réduisent considérablement l'activation de la voie PI3k/Akt dans plusieurs types cellulaires, comme les hépatocytes en cultures primaires, les cellules HepG2 et même les cellules nerveuses hypothalamiques (Xia et al, 2007 ; Mayer et Belsham, 2010 ; Mordier and Iynedjian, 2007). Toutefois, dans notre étude, nous montrons dans un premier temps que l'addition du C6 aux cultures cellulaires soumises ou non à la lipotoxicité semble accentuer la résistance à l'insuline (traduite par la perte d'activation de la protéine Akt, **figure 3.A et 3.B de la section résultats**). Cela pourrait suggérer que dans ces conditions les MCFA aggravent la résistance à l'insuline (**figure 3.A et 3.B de la section résultats**). Paradoxalement, un effet strictement opposé sur l'activation de la p70s6k située en aval dans la voie de signalisation PI3k/Akt est observé. L'administration de C6 potentialise la phosphorylation de l'unité p70s6k, et cela aussi bien en condition normale que lipotoxique avec ou sans stimulation à l'insuline. Étant donné que les protéines Akt et p70s6k appartiennent à la même voie de signalisation PI3k/Akt (Matsuda et al, 2013) il nous semblait alors difficile de statuer à ce stade sur le statut de la sensibilité à l'insuline.

4.2.3 Le C6 favorise bel et bien la réponse des cellules à l'insuline :

Le test de synthèse du glycogène effectué dans un second temps (**figure 4 de la section résultats**) est toutefois sans équivoque. Le C6 améliore significativement la réponse des hépatocytes à l'insuline. Pour vérifier l'impact du C6 sur la réponse cellulaire à l'insuline, et donc la sensibilité à l'insuline, des cultures primaires d'hépatocytes ont été à nouveau cultivées dans les mêmes conditions, c'est-à-dire en présence ou non de palmitate puis en présence ou en absence de C6. Au terme d'une stimulation finale de 4h avec de l'insuline, les taux de glycogène intracellulaire ont été mesurés (voir la

figure 4 de la section résultats pour les détails expérimentaux). Il se trouve qu'aussi bien en condition lipotoxique qu'en condition non lipotoxique, l'administration de C6 augmente significativement par un facteur 2.5 la synthèse du glycogène induite par l'insuline dans les hépatocytes. Dans les conditions testées, nous démontrons clairement que le C6 diminue la résistance à l'insuline induite par le palmitate. L'efficacité de l'induction de la résistance à l'insuline dans cette expérience est d'ailleurs illustrée par le fait qu'en condition lipotoxique sans C6 la stimulation à l'insuline n'exerce aucun effet comparé au contrôle. Afin de consolider ces observations il serait intéressant de les compléter en analysant par des immunobuvardages de type Western les niveaux d'activation des enzymes glycogène synthétase (GS) et glycogène phosphorylase α (GP α) (Lew et al., 2015, Ciudad et al., 1988) dans des hépatocytes soumis aux mêmes conditions d'incubation que celles présentées en **figure 4**. L'incubation des cellules 24h avec du C6 devrait alors être associée à une hausse relative des niveaux d'expression et de phosphorylation de l'enzyme GS (Lew et al., 2015, Ciudad et al., 1988). Il semble cependant étonnant de constater que le C6 tout en inhibant drastiquement l'activation de la protéine Akt induite par l'insuline, puisse être associé à cette hausse significative de la synthèse de glycogène, alors qu'il est bien connu qu'Akt stimule la biosynthèse du glycogène via l'inhibition de GSK3, le principal bloqueur de l'activité de l'enzyme GS (Zoncu et al, 2011).

4.2.4 Et si le C6 potentialisait les réponses cellulaires à l'insuline justement en instaurant une "insulinorésistance sélective" ?

La base mécanistique du paradoxe relevé plus haut n'a pas encore fait l'objet d'une étude précise, mais il est possible d'émettre une hypothèse basée sur le concept "d'insulinorésistance sélective" (Li et al, 2010 ; Laplante et Sabatini, 2010). En effet, outre l'activation de la lipogenèse *de novo* via SREBP-1c, Akt est aussi impliqué dans l'activation de la néoglucogenèse. En temps normal, la protéine Akt activée phosphoryle

le facteur FOXO (Forkhead box O1), empêchant l'activation transcriptionnelle de la protéine PEPCK (Phosphoenolpyruvate carboxykinase), un activateur important de la néoglucogenèse (Li et al, 2010 ; Laplante et Sabatini, 2010). Dans un état d'insulinorésistance induite par l'accumulation de lipides dans les cellules, l'inactivation de la protéine Akt par les mécanismes décrits plus haut a donc comme effet inverse de stimuler la néoglucogenèse (ou du moins de ne pas l'inhiber). Le glucose produit par la néoglucogenèse continue alors d'exercer un effet stimulateur sur la lipogenèse, malgré l'état général de résistance à l'insuline. C'est ce qui définit littéralement l'insulinorésistance sélective et qui pourrait apporter un élément de réponse au paradoxe apparent soulevé par les résultats de notre étude (Li et al, 2010 ; Laplante et Sabatini, 2010). Il est en effet possible d'imaginer que la chute drastique induite par le C6 au niveau des hépatocytes sur l'activation de la protéine Akt (**figure 3 de la section résultats**) stimule la production de glucose via la néoglucogenèse, fournissant ainsi le précurseur principal tant pour la lipogenèse *de novo* que pour la biosynthèse *de novo* du glycogène. Cette hypothèse reste à vérifier, mais, pour la soutenir, la **figure 1** de la section résultats montre bien que la présence d'hexanoate seul (sans insuline et sans T3) induit un certain niveau de lipogenèse *de novo* traduit par un taux de synthèse des triglycérides avoisinant celui retrouvé en présence d'insuline ou de T3 seules. Les lipides accumulés peuvent servir de précurseurs à la néoglucogenèse. Cette hypothèse reste à étudier. Pour cela il serait envisageable dans un premier temps de soumettre des cultures cellulaires aux mêmes conditions que celles présentées en **figure 4** de la section résultats, puis d'en mesurer par des immunobuvardages de type Western et des RT-PCR les niveaux d'expression et d'activation de l'enzyme PEPCK qui devraient alors, si l'hypothèse d'une insulinorésistance sélective était avérée, être inversement corrélés à ceux de la protéine Akt, selon la présence ou l'absence de C6.

4.2.5 L'induction directe de l'axe mTOR/p70s6k pourrait être en cause dans la rétroinhibition de la voie PI3k/Akt :

L'autre aspect important des résultats a été mentionné plus haut, et il s'agit de l'inactivation de l'Akt observé en même temps qu'une activation des p70s6k, au niveau des hépatocytes exposés au C6 en conditions lipotoxiques ou non, avec insuline. À titre de rappel (voir l'état des connaissances pour plus de détails), le signal insulinémique active la voie PI3k/Akt en commençant par induire l'autophosphorylation du récepteur à l'insuline ce qui catalyse l'activation des IRS1/2 par la phosphorylation de résidus tyrosines. Il s'en suit une cascade d'événements aboutissant, dans l'ordre, à l'activation des protéines PI3k puis Akt (LoPiccolo et al., 2008). Cette dernière, une fois entièrement activée par la phosphorylation de ses résidus Ser473 et Thr308, active le complexe mTORC1 en inhibant le complexe TSC1/2 ainsi que PRAS40. (Lopiccolo et al, 2008 ; Li et al, 2010 ; Laplante et Sabatini, 2010). Le complexe mTORC1 active à son tour la kinase en aval p70s6k pour stimuler la protéosynthèse et la croissance cellulaire ainsi que SREBP-1c afin de favoriser en parallèle la lipogenèse (Lopiccolo et al, 2008 ; Li et al, 2010 ; Laplante et Sabatini, 2010). En théorie, les niveaux d'activation des protéines Akt et p70s6k, durant une stimulation à l'insuline de seulement 15 minutes, devraient donc être corrélées.

Or, les résultats de notre étude montrent clairement que l'addition du C6, indépendamment du niveau de lipotoxicité, réduit la phosphorylation d'Akt malgré la stimulation à l'insuline alors que les niveaux d'activation de p70s6k sont augmentés. Cette donnée suggère fortement qu'en présence de C6, indépendamment du signal insulinémique, le complexe mTORC1 est activé d'une manière totalement indépendante de la voie PI3k/Akt. Le niveau d'activité de p70s6k est en effet toujours considéré comme un indicateur fiable et direct de l'activité de mTORC1 (Liu et al, 2011 ; Mordier et Iynedjan, 2007 ; Thèse de doctorat de Frédéric Tremblay, 2004). La phosphorylation prolongée (il est question d'une incubation de 24h en présence de C6) de l'axe

mTORC1/p70s6k causerait à son tour un effet de rétroinhibition sur la voie PI3k/Akt se traduisant par l'inactivation de la protéine Akt (Bertrand et al., 2013). A titre d'exemple, il a déjà été rapporté expérimentalement sur des cardiomyocytes de rats (des cellules métaboliques importantes) que la phosphorylation de l'axe mTORC1/p70s6k par la leucine durant une incubation d'une heure, induit une boucle rétro-inhibitrice ayant pour effet d'activer la phosphorylation des IRS1/2 sur leurs résidus sérines inhibant la voie dépendant de leur phosphorylation sur résidus tyrosine, et le tout sans le moindre impact significatif sur le transport insulino-dépendant du glucose (Bertrand et al, 2013). Les résultats de Bertrand et al semblent rejoindre ceux de notre étude puisqu'il est précisément question d'une possible inhibition de la voie PI3k/Akt par le C6 malgré une stimulation apparente de la synthèse de glycogène insulino-dépendante (**voir les figures 3 et 4** de la section résultats).

4.2.6 L'administration de C6 n'augmente pas les taux d'acides phosphatidiques connus pour activer mTORC1 :

Il reste à élucider la cause de l'activation du complexe mTORC1 en présence de C6. Pour cela, il faut se tourner vers la régulation non hormono-dépendante de mTORC1. Ce dernier est également régulé par les nutriments et le métabolisme de l'énergie (Zoncu et al, 2011). Au niveau nutritionnel ce sont principalement les acides aminés, dans un contexte favorable à la protéosynthèse positivement régulée par mTORC1, qui sont connus comme étant les principaux activateurs de ce complexe via l'activation des RAG-A/B GTP (Zoncu et al, 2011). Par ailleurs, les dérivés métaboliques des lipides, comme l'acide phosphatidique (AP) dont la genèse est brièvement décrite dans l'état des connaissances, sont documentés comme étant des activateurs directs de la protéine kinase mTOR, l'élément essentiel du complexe mTORC1 (Foster et al, 2014 ; You et al, 2012 ; Foster , 2014).

Nous avons donc pensé que l'addition de C6 sur les cellules pouvait contribuer à élever les taux cellulaires d'acides phosphatidiques, expliquant peut-être l'augmentation de

l'activité mTORC1 traduite par la hausse de la phosphorylation de p70s6k. Pour vérifier cela, des cellules de la lignée HepG2 ont été soumises ou non à une lipotoxicité induite par le palmitate (2mM) en présence ou en absence de C6. Les cellules ont alors fait l'objet d'un dosage des acides phosphatidiques cellulaires totaux suivant la procédure décrite en méthodologie (**figure 5 de la section résultats**). Cependant les résultats présentés en **figure 5** montrent que la présence du C6 dans le milieu de culture n'augmente pas significativement les niveaux cellulaires d'acides phosphatidiques totaux, et cela aussi bien en condition lipotoxique qu'en condition non lipotoxique. En revanche, la même figure montre que la présence de palmitate (condition lipotoxique) augmente significativement et par un facteur 2 les niveaux cellulaires d'acides phosphatidiques totaux, en accord avec la théorie voulant que l'acide phosphatidique soit un intermédiaire de l'estérification des LCFA (voir l'état des connaissances).

4.2.7 Le C6 est sûrement impliqué dans la régulation énergétique, et non nutritionnelle, de mTORC1 :

Les deux observations présentées dans la **figure 5** offrent un dernier indice utile à la compréhension du mécanisme mis en jeu lors de l'activation de l'axe mTOR/p70s6k par le C6 indépendamment de l'induction hormonale de la voie PI3k/Akt. Puisque l'addition de 5mM de C6 dans le milieu de culture des cellules HepG2 (sans palmitate) n'augmente pas le contenu cellulaire en acides phosphatidiques totaux alors que l'addition des 2mM de palmitate la double, cela suggère que le C6 est moins mobilisé que le palmitate pour l'estérification et la synthèse des triglycérides. Il est à rappeler en effet que les acides phosphatidiques tout comme les acides lysophosphatidiques et les diacylglycérols sont les intermédiaires métaboliques de l'estérification des acides gras libres en triglycérides (voir l'état des connaissances) (Coleman et Mashek, 2011 ; Foster et al, 2014). Étant donné que les MCFA, contrairement aux LCFA, ont la capacité de diffuser par transport passif à travers les membranes cellulaires, leur entrée dans la mitochondrie se fait à 80% indépendamment de la navette CPT1 dont l'activité est

cinétiquement limitante (Papamandjaris, 1998). Sur la base des études préalablement publiées (Papamandjaris, 1998) nos travaux suggèrent que le C6 serait davantage mobilisé pour la β -oxydation que le palmitate qui serait préférentiellement estérifié. La β -oxydation sûrement favorisée en présence de C6 a certainement pour effet d'augmenter la synthèse mitochondriale d'ATP, activant ainsi le complexe mTORC1 (Zoncu et al, 2011 ; Mordier et Iynedjian, 2007). Le complexe mTORC1 est effectivement hautement régulé aussi par la balance énergétique via l'AMPK (Zoncu et al, 2011). La chute du ratio AMP:ATP résultant de l'accumulation d'ATP a pour effet de réduire la phosphorylation d'AMPK qui, à l'état phosphorylé, inhibe l'activité de mTORC1 via la phosphorylation de Rheb et Raptor (un élément du complexe mTORC1 régulant l'activité kinase de mTOR) (Zoncu et al, 2011 ; Mordier et Iynedjian, 2007). La chute du ratio AMP:ATP pouvant résulter de la β -oxydation du C6 pourrait de cette manière induire l'activation de l'axe mTOR/p70s6k, d'une manière continue, indépendamment du signal insulinémique. Pour vérifier cette hypothèse, il est proposé de soumettre des cellules HepG2 et des cultures primaires de rats à des conditions similaires, soit en présence ou non de C6, avec ou sans palmitate. Pour chacune des conditions, les niveaux de respiration mitochondriale directement proportionnelle aux taux de synthèse d'ATP seront mesurés (Figueiredo et al., 2009). En parallèle, les niveaux de phosphorylation de l'AMPk seront évalués par des immunobuvardages de type Western. Conformément au modèle proposé, il est attendu d'observer, en présence de C6, une stimulation de la respiration mitochondriale associée à une baisse des niveaux de phosphorylation de l'AMPk, et cela aussi bien en condition lipotoxique qu'en condition standard.

4.2.8 Récapitulatif du mécanisme général proposé pour les effets du C6 sur la sensibilité à l'insuline :

Au final, les connaissances théoriques, les données de la littérature et les résultats obtenus au cours de la réalisation de cette étude auront permis d'établir un scénario cohérent et intégratif. Le scénario que nous proposons voudrait que le C6 potentialise la réponse des hépatocytes à l'insuline, dans des conditions lipotoxiques ou non, tout en favorisant sans doute la néoglucogenèse, via la rétroinhibition des séquences en amont de la voie PI3/Akt due à l'activation constitutive de l'axe mTOR/p70s6k résultant du bilan énergétique favorisé par la β -oxydation du C6.

4.3 Conclusion :

En conclusion de cette étude, il est possible d'affirmer que le C6 présente des effets très positifs, conformément à ce qui était attendu, sur le métabolisme des lipides et la sensibilité à l'insuline au niveau des hépatocytes.

En premier lieu, nous avons montré que le C6 inhibe significativement le rendement de la lipogenèse *de novo* induite par l'insuline et l'hormone T3 dans les hépatocytes. L'inhibition du rendement en présence du C6 s'est traduite par une baisse significative de 50% de la synthèse des triglycérides induite par les deux hormones dans les hépatocytes de rats en culture. Cet effet était corrélé avec l'expression au niveau transcriptionnel des gènes *FASN* et *ACACA* dans les hépatocytes de rats en culture et dans les cellules de la lignée HepG2. Nous avons donc émis l'hypothèse que le C6 ou ses métabolites puissent interagir avec certains éléments des voies de signalisation activées en synergie par l'insuline et l'hormone T3.

En second lieu, nous avons montré que le C6 agit comme un agent potentiateur de la réponse cellulaire à l'insuline, aussi bien en condition lipotoxique qu'en condition non lipotoxique. Cet effet s'est traduit par une hausse significative de la synthèse insulino-dépendante du glycogène en présence de C6 dans les hépatocytes de rats en culture, tant

en présence qu'en absence d'une dose lipotoxique de palmitate. Les résultats nous ont en outre permis de suggérer que le C6 activerait, par l'augmentation de la production d'ATP, l'axe mTOR/p70s6k en court-circuitant et en causant la rétroinhibition de la voie afférente PI3k/Akt. Cela maintiendrait en parallèle un niveau suffisamment élevé de néoglucogenèse, contribuant à fournir les précurseurs glucidiques nécessaires à la synthèse de glycogène. Ces hypothèses restent à vérifier par le biais de recherches plus approfondies.

4.4 Perspectives :

Les premiers résultats obtenus dans cette étude préliminaire permettent d'en apprendre davantage sur les mécanismes via lesquels le C6 exerce ses effets métaboliquement bénéfiques. Au niveau des hépatocytes, le C6 limite l'anabolisme des lipides et il améliore la sensibilité à l'insuline dans des conditions lipotoxiques. Ces deux paramètres métaboliques ont été spécialement étudiés car ils sont sévèrement débalancés lors d'un stockage ectopique des lipides lié à plusieurs maladies métaboliques comme l'obésité ou la stéatose hépatique non alcoolique. Ici, l'accumulation des acides gras dans les hépatocytes a été induite par une exposition à une dose lipotoxique de palmitate, afin de mimer *in-vitro* le stockage ectopique des lipides.

Les résultats obtenus dans cette étude viennent donc corroborer les hypothèses selon lesquelles les MCFA peuvent servir d'agents nutraceutiques pour la prévention et le traitement des symptômes métaboliques associés à l'obésité comme le diabète de type 2 et la déposition des graisses.

Afin de compléter cet aspect de l'étude mené *in-vitro* il serait important de vérifier d'abord la fiabilité du modèle proposé plus haut, soit celui d'une induction directe de l'axe mTOR/p70s6k par le C6 via l'accumulation des réserves d'ATP par le biais de sa propre réaction de β -oxydation et l'inhibition de l'AMPk.

Ensuite, puisque les données recueillies au cours de cette étude permettent de suggérer que le C6 limite la lipogenèse et qu'il restaure la sensibilité à l'insuline au niveau des cultures cellulaires, il serait intéressant de vérifier s'il exerce des effets protecteurs contre le développement des autres affections cellulaires résultant du stockage ectopique des lipides, comme le stress du réticulum endoplasmique et la sécrétion des facteurs proinflammatoires dans des conditions lipotoxiques, dans des cultures cellulaires.

Nous prévoyons, à court terme, de confirmer les résultats obtenus dans cette étude, mais sur un modèle animal. Il sera en effet intéressant de tester si, chez des populations de rats de laboratoires obèses comparés à des animaux sains, une diète enrichie en MCFA peut induire les effets qui ont été vus ici, à savoir une inhibition de la voie de la lipogenèse *de novo* hépatique et une amélioration de la sensibilité à l'insuline marquée par une bonne tolérance au glucose. Chez les mêmes groupes d'animaux, il sera intéressant de voir si ces effets prévus s'accompagnent d'une limitation de l'inflammation locale et chronique.

Enfin, ce qui serait une première tentative dans le monde scientifique serait de vérifier si les MCFA exercent des effets positifs sur la santé et l'équilibre de la flore intestinale. En effet, il a été démontré que l'obésité s'accompagne aussi d'un déséquilibre de la flore intestinale. Nous prévoyons de vérifier cela en analysant la diversité des bactéries commensales intestinales des rats de laboratoires obèses et non obèses nourris ou non avec une diète enrichie en MCFA.

Au vu des données de la littérature et des résultats de la littérature, nous pensons que les MCFA présenteront les effets métaboliquement bénéfiques escomptés, renforçant l'idée de leur utilisation chez les humains, à terme, dans les stratégies diététiques et nutritionnelles consacrées à la lutte et à la prévention contre l'obésité.

BIBLIOGRAPHIE

- AKPA, M. M., POINT, F., SAWADOGO, S., RADENNE, A. & MOUNIER, C. 2010. Inhibition of insulin and T3-induced fatty acid synthase by hexanoate. *Lipids*, 45, 997-1009.
- ALUKO, R. 2012. Bioactive Lipids. 23-36.
- AMEER, F., SCANDIUZZI, L., HASNAIN, S., KALBACHER, H. & ZAIDI, N. 2014. De novo lipogenesis in health and disease. *Metabolism*, 63, 895-902.
- ARUNIMA, S. & RAJAMOHAN, T. 2014. Influence of virgin coconut oil-enriched diet on the transcriptional regulation of fatty acid synthesis and oxidation in rats - a comparative study. *Br J Nutr*, 111, 1782-90.
- ATHENSTAEDT, K. & DAUM, G. 2006. The life cycle of neutral lipids: synthesis, storage and degradation. *Cell Mol Life Sci*, 63, 1355-69.
- BERG, A. H., COMBS, T. P. & SCHERER, P. E. 2002. ACRP30/adiponectin: an adipokine regulating glucose and lipid metabolism. *Trends Endocrinol Metab*, 13, 84-9.
- BERTRAND, L., GINION, A., AUQUIER, J., HUE, L., VANOVERSCHELDE, J. L., HORMAN, S. & BEAULOYE, C. 2013
- P1078 La leucine, un acide aminé branché qui bloque la stimulation insulino-dépendante du transport de glucose indépendamment de la voie de signalisation de l'insuline. *Diabetes and Metabolism*, 39, A49-A50.
- BEYNEN, A. C., BUECHLER, K. F., VAN DER MOLEN, A. J. & GEELLEN, M. J. 1981a. Inhibition of lipogenesis in isolated hepatocytes by 3-amino-1,2,4-triazole. *Toxicology*, 22, 171-8.
- BEYNEN, A. C., VAARTJES, W. J. & GEELLEN, M. J. 1981b. Inhibition of hepatic lipogenesis by alpha-cyano-4-hydroxycinnamate. *Biochim Biophys Acta*, 663, 585-97.
- BRADFORD, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 72, 248-54.
- CAPEAU, J. 2003. [Insulin signaling: mechanisms altered in insulin resistance]. *Med Sci (Paris)*, 19, 834-9.

- CHAN, D. S. & NORAT, T. 2015. Obesity and breast cancer: not only a risk factor of the disease. *Curr Treat Options Oncol*, 16, 341.
- CHEN, G., LIANG, G., OU, J., GOLDSTEIN, J. L. & BROWN, M. S. 2004. Central role for liver X receptor in insulin-mediated activation of Srebp-1c transcription and stimulation of fatty acid synthesis in liver. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101, 11245-50.
- CHEN, J., JEPPESEN, P. B., NORDENTOFT, I. & HERMANSEN, K. 2006. Stevioside Counteracts Beta-Cell Lipotoxicity without Affecting Acetyl CoA Carboxylase. *Rev Diabet Stud*, 3, 178-88.
- CHIRALA, S. S., CHANG, H., MATZUK, M., ABU-ELHEIGA, L., MAO, J., MAHON, K., FINEGOLD, M. & WAKIL, S. J. 2003. Fatty acid synthesis is essential in embryonic development: fatty acid synthase null mutants and most of the heterozygotes die in utero. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100, 6358-63.
- CIUDAD, C. J., CARABAZA, A. & GUINOVART, J. J. 1988. Glycogen synthesis from glucose and fructose in hepatocytes from diabetic rats. *Arch Biochem Biophys*, 267, 437-47.
- COLEMAN, R. A. & MASHEK, D. G. 2011. Mammalian triacylglycerol metabolism: synthesis, lipolysis, and signaling. *Chem Rev*, 111, 6359-86.
- DOU, X., WANG, Z., YAO, T. & SONG, Z. 2011. Cysteine aggravates palmitate-induced cell death in hepatocytes. *Life Sci*, 89, 878-85.
- EBBESSON, S. O., RISICA, P. M., EBBESSON, L. O., KENNISH, J. M. & TEJERO, M. E. 2005. Omega-3 fatty acids improve glucose tolerance and components of the metabolic syndrome in Alaskan Eskimos: the Alaska Siberia project. *Int J Circumpolar Health*, 64, 396-408.
- ERION, D. M., POPOV, V., HSIAO, J. J., VATNER, D., MITCHELL, K., YONEMITSU, S., NAGAI, Y., KAHN, M., GILLUM, M. P., DONG, J., MURRAY, S. F., MANCHEM, V. P., BHANOT, S., CLINE, G. W., SHULMAN, G. I. & SAMUEL, V. T. 2013. The role of the carbohydrate response element-binding protein in male fructose-fed rats. *Endocrinology*, 154, 36-44.
- FIGUEIREDO, P. A., POWERS, S. K., FERREIRA, R. M., AMADO, F., APPELL, H. J. & DUARTE, J. A. 2009. Impact of lifelong sedentary behavior on mitochondrial function of mice skeletal muscle. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*, 64, 927-39.

- FOSTER, D. A., SALLOUM, D., MENON, D. & FRIAS, M. A. 2014. Phospholipase D and the maintenance of phosphatidic acid levels for regulation of mammalian target of rapamycin (mTOR). *J Biol Chem*, 289, 22583-8.
- FRAYN, K. N. 2005. Obesity and metabolic disease: is adipose tissue the culprit? *Proc Nutr Soc*, 64, 7-13.
- FUKUSHIMA, J., KAMADA, Y., MATSUMOTO, H., YOSHIDA, Y., EZAKI, H., TAKEMURA, T., SAJI, Y., IGURA, T., TSUTSUI, S., KIHARA, S., FUNAHASHI, T., SHIMOMURA, I., TAMURA, S., KISO, S. & HAYASHI, N. 2009. Adiponectin prevents progression of steatohepatitis in mice by regulating oxidative stress and Kupffer cell phenotype polarization. *Hepatol Res*, 39, 724-38.
- GAO, D., NONG, S., HUANG, X., LU, Y., ZHAO, H., LIN, Y., MAN, Y., WANG, S., YANG, J. & LI, J. 2010. The effects of palmitate on hepatic insulin resistance are mediated by NADPH Oxidase 3-derived reactive oxygen species through JNK and p38MAPK pathways. *J Biol Chem*, 285, 29965-73.
- GATSELIS, N. K., NTAIOS, G., MAKARITSIS, K. & DALEKOS, G. N. 2014. Adiponectin: a key playmaker adipocytokine in non-alcoholic fatty liver disease. *Clin Exp Med*, 14, 121-31.
- GOODRIDGE, A. G., THURMOND, D. C., BAILLIE, R. A., HODNETT, D. W. & XU, G. 1998. Nutritional and hormonal regulation of the gene for malic enzyme. *Z Ernährungswiss*, 37 Suppl 1, 8-13.
- GRACEY, M., BURKE, V. & ANDERSON, C. M. 1970. Medium chain triglycerides in paediatric practice. *Arch Dis Child*, 45, 445-52.
- GUO, Y., CORDES, K. R., FARESE, R. V., JR. & WALTHER, T. C. 2009. Lipid droplets at a glance. *J Cell Sci*, 122, 749-52.
- HARBRECHT, B. G., WIRANT, E. M., KIM, Y. M. & BILLIAR, T. R. 1996. Glucagon inhibits hepatocyte nitric oxide synthesis. *Arch Surg*, 131, 1266-72.
- HARRIS, C. A., HAAS, J. T., STREEPER, R. S., STONE, S. J., KUMARI, M., YANG, K., HAN, X., BROWNELL, N., GROSS, R. W., ZECHNER, R. & FARESE, R. V., JR. 2011. DGAT enzymes are required for triacylglycerol synthesis and lipid droplets in adipocytes. *J Lipid Res*, 52, 657-67.
- HASLAM, D. W. & JAMES, W. P. T. 2005. Obesity. *The Lancet*, 366, 1197-1209.
- HECKER, M., SOMMER, N., VOIGTMANN, H., PAK, O., MOHR, A., WOLF, M., VADASZ, I., HEROLD, S., WEISSMANN, N., MORTY, R. E., SEEGER, W.

- & MAYER, K. 2013. Impact of Short- and Medium-Chain Fatty Acids on Mitochondrial Function in Severe Inflammation. *JPEN J Parenter Enteral Nutr*, 38, 587-594.
- HILLGARTNER, F. B. & CHARRON, T. 1997. Arachidonate and medium-chain fatty acids inhibit transcription of the acetyl-CoA carboxylase gene in hepatocytes in culture. *J Lipid Res*, 38, 2548-57.
- HORTON, J. D., GOLDSTEIN, J. L. & BROWN, M. S. 2002. SREBPs: activators of the complete program of cholesterol and fatty acid synthesis in the liver. *Journal of Clinical Investigation*, 109, 1125-1131.
- IEMITSU, M., SHIMOJO, N., MAEDA, S., IRUKAYAMA-TOMOBE, Y., SAKAI, S., OHKUBO, T., TANAKA, Y. & MIYAUCHI, T. 2008. The benefit of medium-chain triglyceride therapy on the cardiac function of SHR is associated with a reversal of metabolic and signaling alterations. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 295, H136-44.
- JIN, F. Y., KAMANNA, V. S. & KASHYAP, M. L. 1999. Niacin Accelerates Intracellular ApoB Degradation by Inhibiting Triacylglycerol Synthesis in Human Hepatoblastoma (HepG2) Cells. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 19, 1051-1059.
- KERSTEN, S. 2001. Mechanisms of nutritional and hormonal regulation of lipogenesis. *EMBO Rep*, 2, 282-6.
- KIM, F., PHAM, M., LUTTRELL, I., BANNERMAN, D. D., TUPPER, J., THALER, J., HAWN, T. R., RAINES, E. W. & SCHWARTZ, M. W. 2007. Toll-like receptor-4 mediates vascular inflammation and insulin resistance in diet-induced obesity. *Circ Res*, 100, 1589-96.
- KIMURA, I., INOUE, D., MAEDA, T., HARA, T., ICHIMURA, A., MIYAUCHI, S., KOBAYASHI, M., HIRASAWA, A. & TSUJIMOTO, G. 2011. Short-chain fatty acids and ketones directly regulate sympathetic nervous system via G protein-coupled receptor 41 (GPR41). *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108, 8030-5.
- KOHLWEIN, S. D., VEENHUIS, M. & VAN DER KLEI, I. J. 2013. Lipid droplets and peroxisomes: key players in cellular lipid homeostasis or a matter of fat--store 'em up or burn 'em down. *Genetics*, 193, 1-50.
- LAPLANTE, M. & SABATINI, D. M. 2010. mTORC1 activates SREBP-1c and uncouples lipogenesis from gluconeogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107, 3281-2.

- LAVAU, M. M. & HASHIM, S. A. 1978. Effect of medium chain triglyceride on lipogenesis and body fat in the rat. *J Nutr*, 108, 613-20.
- LETTNER, A. & RODEN, M. 2008. Ectopic fat and insulin resistance. *Curr Diab Rep*, 8, 185-91.
- LEW, C. R., GUIN, S. & THEODORESCU, D. 2015. Targeting glycogen metabolism in bladder cancer. *Nat Rev Urol*.
- LI, S., BROWN, M. S. & GOLDSTEIN, J. L. 2010. Bifurcation of insulin signaling pathway in rat liver: mTORC1 required for stimulation of lipogenesis, but not inhibition of gluconeogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107, 3441-6.
- LIU, D., HUANG, Y., CHEN, B., ZENG, J., GUO, N., ZHANG, S., LIU, L., XU, H., MO, X. & LI, W. 2011. Activation of mammalian target of rapamycin pathway confers adverse outcome in nonsmall cell lung carcinoma. *Cancer*, 117, 3763-73.
- LODHI, I. J., WEI, X. & SEMENKOVICH, C. F. 2011. Lipoexpediency: de novo lipogenesis as a metabolic signal transmitter. *Trends Endocrinol Metab*, 22, 1-8.
- LOPICCOLO, J., BLUMENTHAL, G. M., BERNSTEIN, W. B. & DENNIS, P. A. 2008. Targeting the PI3K/Akt/mTOR pathway: effective combinations and clinical considerations. *Drug resistance updates : reviews and commentaries in antimicrobial and anticancer chemotherapy*, 11, 32-50.
- MANCO, M., CALVANI, M. & MINGRONE, G. 2004. Effects of dietary fatty acids on insulin sensitivity and secretion. *Diabetes Obes Metab*, 6, 402-13.
- MARTEN, B., PFEUFFER, M. & SCHREZENMEIR, J. 2006. Medium-chain triglycerides. *International Dairy Journal*, 16, 1374-1382.
- MASTORAKOS, G., KONSTANTINOS, L. & VALSAMAKIS, G. 2000. New molecular targets for the Pharmacotherapy of Obesity. In: DE GROOT, L. J., BECK-PECCOZ, P., CHROUSOS, G., DUNGAN, K., GROSSMAN, A., HERSHMAN, J. M., KOCH, C., MCLACHLAN, R., NEW, M., REBAR, R., SINGER, F., VINIK, A. & WEICKERT, M. O. (eds.) *Endotext*. South Dartmouth MA: MDText.com, Inc.
- MATSUDA, S., KOBAYASHI, M. & KITAGISHI, Y. 2013. Roles for PI3K/AKT/PTEN Pathway in Cell Signaling of Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *ISRN Endocrinol*, 2013, 472432.

- MATSUZAKA, T., ATSUMI, A., MATSUMORI, R., NIE, T., SHINOZAKI, H., SUZUKI-KEMURIYAMA, N., KUBA, M., NAKAGAWA, Y., ISHII, K., SHIMADA, M., KOBAYASHI, K., YATOH, S., TAKAHASHI, A., TAKEKOSHI, K., SONE, H., YAHAGI, N., SUZUKI, H., MURATA, S., NAKAMUTA, M., YAMADA, N. & SHIMANO, H. 2012. Elovl6 promotes nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology*, 56, 2199-208.
- MATSUZAKA, T. & SHIMANO, H. 2011. Molecular mechanisms involved in hepatic steatosis and insulin resistance. *J Diabetes Investig*, 2, 170-5.
- MATTES, R. & FOSTER, G. D. 2014. Food environment and obesity. *Obesity (Silver Spring)*, 22, 2459-61.
- MAUVOISIN, D. & MOUNIER, C. 2011. Hormonal and nutritional regulation of SCD1 gene expression. *Biochimie*, 93, 78-86.
- MAUVOISIN, D., PREVOST, M., DUCHEIX, S., ARNAUD, M. P. & MOUNIER, C. 2010. Key role of the ERK1/2 MAPK pathway in the transcriptional regulation of the Stearoyl-CoA Desaturase (SCD1) gene expression in response to leptin. *Mol Cell Endocrinol*, 319, 116-28.
- MAYER, C. M. & BELSHAM, D. D. 2010. Palmitate attenuates insulin signaling and induces endoplasmic reticulum stress and apoptosis in hypothalamic neurons: rescue of resistance and apoptosis through adenosine 5' monophosphate-activated protein kinase activation. *Endocrinology*, 151, 576-85.
- MCDANIEL, S. S., RENSING, N. R., THIO, L. L., YAMADA, K. A. & WONG, M. 2011. The ketogenic diet inhibits the mammalian target of rapamycin (mTOR) pathway. *Epilepsia*, 52, e7-e11.
- MCDEVITT, R. M., BOTT, S. J., HARDING, M., COWARD, W. A., BLUCK, L. J. & PRENTICE, A. M. 2001. De novo lipogenesis during controlled overfeeding with sucrose or glucose in lean and obese women. *Am J Clin Nutr*, 74, 737-46.
- MIYAZAKI, M., FLOWERS, M. T., SAMPATH, H., CHU, K., OTZELBERGER, C., LIU, X. & NTAMBI, J. M. 2007. Hepatic stearoyl-CoA desaturase-1 deficiency protects mice from carbohydrate-induced adiposity and hepatic steatosis. *Cell Metab*, 6, 484-96.
- MOON, Y. A., SHAH, N. A., MOHAPATRA, S., WARRINGTON, J. A. & HORTON, J. D. 2001. Identification of a mammalian long chain fatty acyl elongase regulated by sterol regulatory element-binding proteins. *J Biol Chem*, 276, 45358-66.

- MORDIER, S. & IYNEDJIAN, P. B. 2007. Activation of mammalian target of rapamycin complex 1 and insulin resistance induced by palmitate in hepatocytes. *Biochem Biophys Res Commun*, 362, 206-11.
- NAGAO, K. & YANAGITA, T. 2008. Bioactive lipids in metabolic syndrome. *Prog Lipid Res*, 47, 127-46.
- NAKAMURA, M. T., CHEON, Y., LI, Y. & NARA, T. Y. 2004. Mechanisms of regulation of gene expression by fatty acids. *Lipids*, 39, 1077-83.
- NAVE, K. A. & WERNER, H. B. 2014. Myelination of the nervous system: mechanisms and functions. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 30, 503-33.
- NYE, C. K., HANSON, R. W. & KALHAN, S. C. 2008. Glyceroneogenesis is the dominant pathway for triglyceride glycerol synthesis in vivo in the rat. *J Biol Chem*, 283, 27565-74.
- PAPAMANDJARIS, A. A., MACDOUGALL, D. E. & JONES, P. J. 1998. Medium chain fatty acid metabolism and energy expenditure: obesity treatment implications. *Life Sci*, 62, 1203-15.
- PAPAMANDJARIS, A. A., WHITE, M. D., RAEINI-SARJAZ, M. & JONES, P. J. 2000. Endogenous fat oxidation during medium chain versus long chain triglyceride feeding in healthy women. *Int J Obes Relat Metab Disord*, 24, 1158-66.
- PARK, Y. S., JANG, H. J., LEE, K. H., HAHN, T. R. & PAIK, Y. S. 2006. Prolyl endopeptidase inhibitory activity of unsaturated fatty acids. *J Agric Food Chem*, 54, 1238-42.
- POSTIC, C., DENTIN, R., DENECHAUD, P. D. & GIRARD, J. 2007. ChREBP, a transcriptional regulator of glucose and lipid metabolism. *Annu Rev Nutr*, 27, 179-92.
- POSTIC, C. & GIRARD, J. 2008. Contribution of de novo fatty acid synthesis to hepatic steatosis and insulin resistance: lessons from genetically engineered mice. *J Clin Invest*, 118, 829-38.
- RADENNE, A., AKPA, M., MARTEL, C., SAWADOGO, S., MAUVOISIN, D. & MOUNIER, C. 2008. Hepatic regulation of fatty acid synthase by insulin and T3: evidence for T3 genomic and nongenomic actions. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 295, E884-94.

- ROGALSKI, M. & CARRER, H. 2011. Engineering plastid fatty acid biosynthesis to improve food quality and biofuel production in higher plants. *Plant Biotechnol J*, 9, 554-64.
- RONCERO, C. & GOODRIDGE, A. G. 1992. Hexanoate and octanoate inhibit transcription of the malic enzyme and fatty acid synthase genes in chick embryo hepatocytes in culture. *J Biol Chem*, 267, 14918-27.
- RUI, L. 2014. Energy metabolism in the liver. *Compr Physiol*, 4, 177-97.
- SAMPATH, H., MIYAZAKI, M., DOBRZYN, A. & NTAMBI, J. M. 2007. Stearoyl-CoA desaturase-1 mediates the pro-lipogenic effects of dietary saturated fat. *J Biol Chem*, 282, 2483-93.
- SCHULTZ, J. R., TU, H., LUK, A., REPA, J. J., MEDINA, J. C., LI, L., SCHWENDNER, S., WANG, S., THOOLEN, M., MANGELSDORF, D. J., LUSTIG, K. D. & SHAN, B. 2000. Role of LXRs in control of lipogenesis. *Genes Dev*, 14, 2831-8.
- SHAH, P. K. 2007. Innate immune pathway links obesity to insulin resistance. *Circ Res*, 100, 1531-3.
- SHARMA, A., BEMIS, M. & DESILETS, A. R. 2014. Role of Medium Chain Triglycerides (Axona(R)) in the Treatment of Mild to Moderate Alzheimer's Disease. *Am J Alzheimers Dis Other Dement*.
- SHIMOMURA, I. 1998. Nuclear Sterol Regulatory Element-binding Proteins Activate Genes Responsible for the Entire Program of Unsaturated Fatty Acid Biosynthesis in Transgenic Mouse Liver. *Journal of Biological Chemistry*, 273, 35299-35306.
- ST-ONGE, M. P. & JONES, P. J. 2002. Physiological effects of medium-chain triglycerides: potential agents in the prevention of obesity. *J Nutr*, 132, 329-32.
- STRABLE, M. S. & NTAMBI, J. M. 2010. Genetic control of de novo lipogenesis: role in diet-induced obesity. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, 45, 199-214.
- STRITTMATTER, P., SPATZ, L., CORCORAN, D., ROGERS, M. J., SETLOW, B. & REDLINE, R. 1974. Purification and properties of rat liver microsomal stearyl coenzyme A desaturase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 71, 4565-9.
- TEGLUND, S., MCKAY, C., SCHUETZ, E., VAN DEURSEN, J. M., STRAVOPODIS, D., WANG, D., BROWN, M., BODNER, S., GROSVELD, G. & IHLE, J. N. 1998. Stat5a and Stat5b proteins have essential and nonessential, or redundant, roles in cytokine responses. *Cell*, 93, 841-50.

- THOMAS, S. M. & BRUGGE, J. S. 1997. Cellular functions regulated by Src family kinases. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 13, 513-609.
- THURMOND, D. C. 1998. Regulation of the Action of Steroid/Thyroid Hormone Receptors by Medium-chain Fatty Acids. *Journal of Biological Chemistry*, 273, 15373-15381.
- THURMOND, D. C., BAILLIE, R. A. & GOODRIDGE, A. G. 1998. Regulation of the action of steroid/thyroid hormone receptors by medium-chain fatty acids. *J Biol Chem*, 273, 15373-81.
- TOU, J. C., ALTMAN, S. N., GIGLIOTTI, J. C., BENEDITO, V. A. & CORDONIER, E. L. 2011. Different sources of omega-3 polyunsaturated fatty acids affects apparent digestibility, tissue deposition, and tissue oxidative stability in growing female rats. *Lipids Health Dis*, 10, 179.
- WAKIL, S. J. 1989. Fatty acid synthase, a proficient multifunctional enzyme. *Biochemistry*, 28, 4523-30.
- WANG, J., WU, X., SIMONAVICIUS, N., TIAN, H. & LING, L. 2006. Medium-chain fatty acids as ligands for orphan G protein-coupled receptor GPR84. *J Biol Chem*, 281, 34457-64.
- WEIN, S., WOLFFRAM, S., SCHREZENMEIR, J., GASPERIKOVA, D., KLIMES, I. & SEBOKOVA, E. 2009. Medium-chain fatty acids ameliorate insulin resistance caused by high-fat diets in rats. *Diabetes Metab Res Rev*, 25, 185-94.
- XIA, N., TANG, Z., WANG, C., XU, G., NIE, X., ZHANG, W., ZHAO, Y., WANG, S., ZHU, X. & CUI, S. 2015. PCBP2 regulates hepatic insulin sensitivity via HIF-1alpha and STAT3 pathway in HepG2 cells. *Biochem Biophys Res Commun*.
- XIA, Y., WAN, X., DUAN, Q., HE, S. & WANG, X. 2007. Inhibition of protein kinase B by palmitate in the insulin signaling of HepG2 cells and the preventive effect of arachidonic acid on insulin resistance. *Front Med China*, 1, 200-6.
- XU, J., NAKAMURA, M. T., CHO, H. P. & CLARKE, S. D. 1999. Sterol Regulatory Element Binding Protein-1 Expression Is Suppressed by Dietary Polyunsaturated Fatty Acids: A MECHANISM FOR THE COORDINATE SUPPRESSION OF LIPOGENIC GENES BY POLYUNSATURATED FATS. *Journal of Biological Chemistry*, 274, 23577-23583.

- YOU, J. S., FREY, J. W. & HORNBERGER, T. A. 2012. Mechanical stimulation induces mTOR signaling via an ERK-independent mechanism: implications for a direct activation of mTOR by phosphatidic acid. *PLoS One*, 7, e47258.
- ZHANG, X. Q., XU, C. F., YU, C. H., CHEN, W. X. & LI, Y. M. 2014. Role of endoplasmic reticulum stress in the pathogenesis of nonalcoholic fatty liver disease. *World J Gastroenterol*, 20, 1768-76.
- ZHOU, X., WU, W., CHEN, J., WANG, X. & WANG, Y. 2015. AMP-activated protein kinase is required for the anti-adipogenic effects of alpha-linolenic acid. *Nutr Metab (Lond)*, 12, 10.
- ZONCU, R., EFEYAN, A. & SABATINI, D. M. 2011. mTOR: from growth signal integration to cancer, diabetes and ageing. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 12, 21-35.